

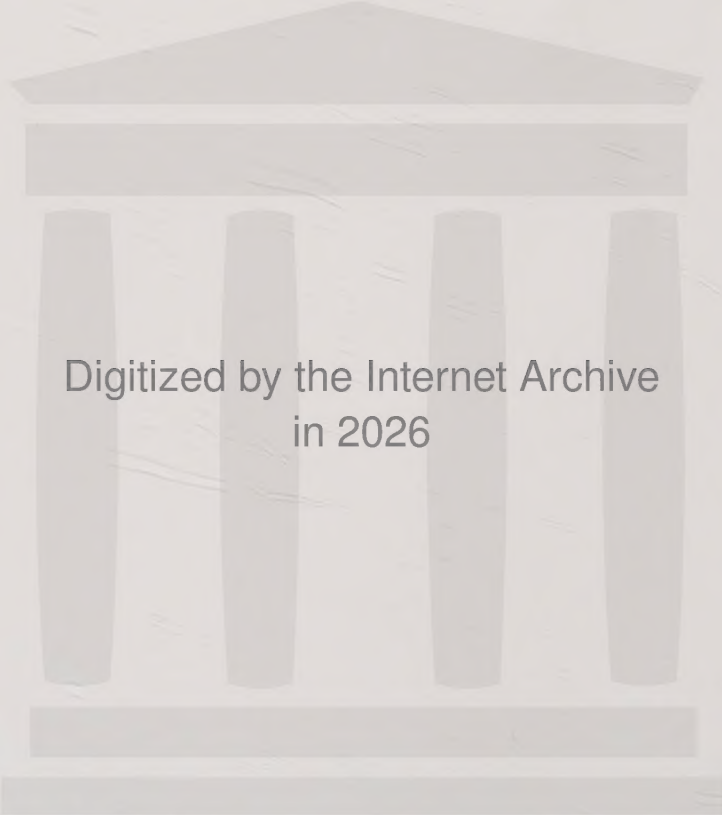
CHARAKTERISIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN-SUBPOPULATIONEN

IN HRS (HAIRLESS)-MÄUSEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Angelika Reske-Kunz
aus Hornberg

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543108_0029

CHARAKTERISIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN-SUBPOPULATIONEN

IN HRS (HAIRLESS)-MÄUSEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Fakultät für Biologie

der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Angelika Reske-Kunz

aus Hornberg

1979

CHARAKTERISIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN-ABNORMALITÄTEN

VON HERRN (HATZEL) - KÄRGER

Leitung: Dr. med. habil. Dr. med. habil.
aus der Abteilung für Pathologie
des Kaiser-Wilhelm-Instituts für
die Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.



Verlag: von
Hugos & Co.
am Hofplatz

1973

Dekan: Prof. Dr. K. Hahlbrock

Leiter der Arbeit: Prof. Dr. F. Melchers

Referent: Prof. Dr. F. Melchers

Korreferent:

Tag der Verkündung des Prüfungsergebnisses:

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Reske-Kunz, A.B., M.P. Scheid, E.A. Boyse. 1979. Disproportion in T-cell subpopulations in immunodeficient mutant hr/hr mice. J. Exp. Med. 149, 228.

Reske-Kunz, A.B., M.P. Scheid, M. de Sousa, E.A. Boyse. Correlation of immunogenetic and histological changes in immunodeficient mutant hr/hr mice. In: Advances in Experimental Medicine and Biology, Plenum Press, im Druck. Proceedings of the VI International Conference on Lymphatic Tissues and Germinal Centers in Immune Reactions, Damp/Kiel, June 11 - 16, 1978.

Ergebnisse von Arbeiten, die über den Rahmen dieser Dissertation hinausgehen, wurden veröffentlicht:

Reske-Kunz, A.B., M.P. Scheid, J. Abbott, L.J. Metakis, M.J. Polley. The action of complement in the lysis of mouse sarcoma cells sensitized with H-2 alloantibody. Transplantation, im Druck.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde während eines Studienaufenthaltes am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA, unter der Leitung von Prof. Dr. Edward A. Boyse und Dr. Margrit P. Scheid durchgeführt.

Prof. Boyse gilt mein herzlichster Dank für die interessante Themenstellung, für zahllose Anregungen und stimulierende Diskussionen sowie für die uneingeschränkte Unterstützung meiner Untersuchungen. Unvergessen wird für mich die freie, wissenschaftlich anregende Atmosphäre bleiben, an der ich teilhaben durfte, und wofür ich sehr dankbar bin.

Besonders herzlich danke ich Frau Dr. Scheid für ihre vorzügliche Anleitung. Ihre kundigen Ratschläge und ihre Aufgeschlossenheit waren für den Fortgang der Arbeit und die Vertiefung meiner wissenschaftlichen Kenntnisse eine große Hilfe.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Prof. Dr. Harvey Cantor, Harvard Medical School, Boston, USA, durch dessen großzügiges Entgegenkommen mir ein längerer Studienaufenthalt in seinem Labor ermöglicht wurde. Dr. Cantor verdanke ich eine gründliche Anleitung zur Bearbeitung funktionell zellulärer Aspekte meiner Arbeit. Sein aktives Interesse und sein förderndes Bemühen haben mir die Einarbeitung in diese Thematik sehr erleichtert.

Schließlich bedanke ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Fritz Melchers, Institut für Immunologie, Basel, Schweiz, für seine uneigennützigte Hilfsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang der Arbeit. Prof. Melchers hat mir als Betreuer der Arbeit in der Fakultät für Biologie der Universität Freiburg größtmögliche wissenschaftliche Freiheit gewährt, die ein Gelingen erst ermöglichte.

Dr. Fung-Win Shen hat mir sehr generös die für diese Untersuchungen benötigten Antiseren überlassen, wofür ich mich bestens bedanke.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
1. Ontogenie von Lymphozyten	1
2. Differenzierungsantigene auf T-Lymphozyten	5
3. Funktionelle Eigenschaften der Lyt-Subpopulationen	12
4. Untersuchung der mutanten hr/hr-Mäuse	16
B. <u>Material und Methoden</u>	19
1. Reagenzien und Tiere	19
1.1 Kulturmedien, Puffer, Lösungen	19
1.2 Mäusestämme	19
1.3 Antiseren	22
1.3.1 Absorption der Antiseren	22
1.3.2 Kontrolle der absorbierten Antiseren	25
1.4 Komplement	25
2. Serologische Untersuchungsmethoden	27
2.1 Zellsuspensionen	27
2.1.1 Präparation von Zellen aus Thymus, Milz und Lymphknoten	27
2.1.2 Präparation von Tumorzellsuspensionen	28
2.1.3 Lyse von Erythrozyten	28
2.1.4 Markierung von Zellen mit radioaktivem ^{51}Cr	29
2.1.5 Bestrahlung von Zellen	29
2.1.6 Anreicherung von T-Lymphozyten mit Hilfe einer Nylonwollsäule	29
2.1.7 Bestimmung von Zahl und Lebensfähigkeit der Zellen	30
2.2 Testsysteme zum Nachweis von Lymphozyten-Oberflächenmarkern	30
2.2.1 Antikörper-Komplement-abhängiger zytotoxischer Test	30
2.2.1.1 Einstufentest	30
2.2.1.2 Zweistufentest	31
2.2.2 Protein A-Rosettentest	32

2.2.3 EAC-Rosettentest	33
2.3 Berechnung der Lyt-Subpopulationen	34
2.4 Antikörper-Komplement-abhängige Eliminierung von Zellen zur Anreicherung von Lymphozyten-Subpopulationen	35
2.4.1 Isolierung von B-Lymphozyten	35
2.4.2 Isolierung von Lyt-1 _i -Zellen	35
2.5 Immunisierung mit Schafserythrozyten in vivo	36
3. Testmethoden für T-Zellfunktionen in vitro	36
3.1 Mitogene Stimulierung von Milzlymphozyten mit Con A und LPS	36
3.2 Mitogene Stimulierung von Milzlymphozyten mit PHA	37
3.3 Proliferation alloreaktiver T-Lymphozyten in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC)	37
3.4 Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten	38
3.5 Zell-vermittelter Zytotoxizitätstest (CML)	38
3.6 In vitro-Antwort von Milzzellen gegen Schafserythrozyten (Mishell-Dutton-System)	39
3.6.1 Induktion einer Primärantwort gegen Schafserythrozyten in unseparierten Milzzellen	39
3.6.2 Kokultivierung von Lyt-1 _i -Zellen mit B-Lymphozyten im Helfersystem	39
3.6.3 Messung der Aktivität von Lyt-1 _i -Lymphozyten im Rückkopplungs-Suppressionssystem	40
3.6.4 Bestimmung von Antikörper-sezierenden Zellen im Plaquetest	40
4. Statistische Auswertung	41
C. <u>Ergebnisse</u>	42
1. Etablierung des Testsystems an B6-Mäusen	42
1.1 Kriterien für die Wahl eines geeigneten Testsystems	42
1.2 Standardisierung des Testsystems	43

1.2.1	Zweistufentest	43
1.2.2	Komplement	44
1.2.3	Antiseren	47
1.2.3.1	Gewährleistung der Spezifität der Alloantiseren	47
1.2.3.2	Titration der Antiseren auf B6- Milzzellen	48
1.3	Bestimmung der Lyt-Subsets in B6-Milz- zellen	51
1.3.1	Lyt-Subsets in jungen B6-Mäusen	51
1.3.2	Reproduzierbarkeit der Subset- bestimmung	51
1.3.3	Ontogenie der Lyt-Setverteilung	53
2.	Serologische Untersuchungen an Lymphozyten von hr/hr-Mäusen	55
2.1	Serologische Charakterisierung der Milz- zellen von hr/hr-Mäusen	55
2.1.1	T- und B-Zellsets	55
2.1.2	Repräsentation der Lyt-Sets	57
2.1.2.1	Untersuchungen an unseparierten Milzzellen im zytotoxischen Test	57
2.1.2.2	Untersuchungen an unseparierten Milzzellen im Protein A-Rosetten- test	60
2.1.2.3	Charakterisierung der gereinigten T-Zellpopulation	62
2.1.2.4	Vergleich von mehreren Hetero- zygoten	63
2.1.2.5	Spezifität des anti-Lyt-1.2- Serums	64
2.1.3	Vergleich der Gesamt-Milzzell- zahlen	66
2.1.4	Untersuchungen an homozygoten HRS-+/-Mäusen als Kontrollgruppe	67
2.2	Serologische Charakterisierung der Lymphknoten von hr/hr-Mäusen	69
2.2.1	Enumeration der T-Zellpopulation	69
2.2.2	Bestimmung der Lyt-Subsets	70
2.3	Serologische Charakterisierung der Thymo- zyten von hr/hr-Mäusen	70
2.3.1	H-2 Expression	70
2.3.2	Repräsentation von Lyt-Sets	72

2.4 Untersuchungen zum Gehalt an Autoantikörpern im Serum unbehandelter Mäuse	74
3. Charakterisierung der Milzzellen von hr/hr-Mäusen anhand ihrer funktionellen Eigenschaften in vitro	76
3.1 Mitogene Stimulierung mit Con A und LPS	77
3.2 Mitogene Stimulierung mit PHA	78
3.3 Primärantwort gegen das T-Zell-abhängige Antigen SRBC	81
3.4 Allogenetische Stimulierung von HRS-Milzzellen	83
3.4.1 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)	84
3.4.2 Zell-vermittelte Zytotoxizität (CML)	88
3.5 Immunologische in vitro-Funktionen von isolierten Lyt-1 _i -Zellen	90
3.5.1 Immune Lyt-1 _i -Zellen als Helfer für B-Zellen	90
3.5.2 Immune Lyt-1 _i -Zellen als Induktoren von Suppressorzellen	93
D. <u>Diskussion</u>	96
1. Serologische Charakterisierung von T-Lymphozyten-Subpopulationen	96
2. In vitro-Funktionen von T-Lymphozyten in Milzen von HRS-Mäusen	103
E. <u>Zusammenfassung</u>	111
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	114

Abkürzungen

AS	Antiserum
BSS	balanced salt solution
CML	cell-mediated lysis
Con A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
CR	complement receptor
DTH	delayed-type hypersensitivity
EAC	erythrocyte-antibody-complement
FCS	fetal calf serum
Ig	Immunglobulin
KK	Komplementkontrolle
LPS	Lipopolysaccharid
Lyt- ¹ _i	immune Lyt-1-Population
MEM	minimales essentielles Medium
MLC	mixed lymphocyte culture
MLR	mixed lymphocyte reaction
NMS	normales Mausserum
PBS	phosphate-buffered saline
PFC	plaque-forming cells
PHA	Phytohämagglutinin
SEM	standard error of the mean
SRBC	sheep red blood cells

A. EINLEITUNG

Wenn sich Zellen eines Organismus neue biochemische, strukturelle und morphologische Eigenschaften aneignen, die für die Ausübung von spezialisierten physiologischen Funktionen notwendig sind, spricht man von Differenzierung (1,2). Die Entwicklung von embryonalen in spezialisierte Zellen geht stufenweise vonstatten. Diesen Übergang charakterisiert eine zunehmende Limitierung des Entwicklungspotentials der Zellen, ausgehend vom totipotenten Zustand über pluripotente Stammzellen, welche in eine begrenzte Zahl nahe verwandter Zelltypen differenzieren können, bis hin zu unipotenten Zellen. Die Limitierung des Entwicklungspotentials hat aller Wahrscheinlichkeit nach genetische Ursachen. Zellen entwickeln sich ihrem genetisch kodierten Programm gehorchend und reagieren auf geeignete externe Stimuli hin mit einer festgelegten Sequenz von Differenzierungsschritten (3). Es ist bisher noch nicht im einzelnen geklärt, welche molekularen Interaktionen dem Differenzierungsablauf zugrunde liegen und die entsprechenden zellulären Veränderungen verursachen. Es gibt jedoch gute Gründe anzunehmen, daß sie auf einer selektiven Aktivierung oder Inaktivierung von Genen basieren (4). In der Tat treten im Verlauf bestimmter Stadien der Zelldifferenzierung charakteristische molekulare Komponenten auf. Stellvertretend seien Myosin, Globin und Immunglobulin genannt, die Myogenese, Erythropoiese und B-Zelldifferenzierung begleiten. Der Prozeß der Differenzierung kann daher auf verschiedenen Ebenen verfolgt werden: nämlich durch das Studium des zeitlichen Ablaufs sich ändernder morphologischer Eigenschaften und des Erscheinens charakteristischer Proteine sowie durch molekularbiologische Analysen auf der Ebene der RNA und DNA.

1. Ontogenie von Lymphozyten

Aufgrund funktioneller Kriterien ist es sinnvoll, Lymphozyten in zwei Hauptgruppen von Immunzellen zu unterteilen.

B-Zellen, welche in ihrer Entwicklung Thymus-unabhängig sind, synthetisieren und sezernieren Antikörper. Sie sind damit die Träger der humoralen Immunität. Demgegenüber sind T-Zellen Thymus-abhängig. Sie sind für Zell-vermittelte Immunreaktionen wie der Transplantatabstoßung (5) und der Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (6) verantwortlich.

Abb. 1 gibt einen Überblick über die sequentiellen Differenzierungsstufen von Lymphozyten (7,8). T- wie B-Zellen entwickeln sich aus gemeinsamen pluripotenten Stammzellen (9), die in Dottersack und fötaler Leber (10,11) sowie Knochenmark und Milz (12) angesiedelt sind. Die Differenzierung und Reifung der Zellen vollzieht sich in den primären lymphatischen Organen, und erst danach treten sie als immunkompetente, Antigen-sensitive T- oder B-Lymphozyten im peripheren lymphatischen System auf (13). In den peripheren lymphatischen Geweben wie z.B. Milz und Lymphknoten sind die Lymphozyten in T- oder B-abhängigen Regionen lokalisiert (14). Nach Antigenstimulierung entwickeln sich B-Lymphozyten zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, während T-Lymphozyten T-Effektorzellen bilden. Daneben entstehen sowohl T- als auch B-Gedächtniszellen.

Der Fragestellung und Thematik dieser Arbeit liegt ein von E.A. Boyse und L.J. Old an Mäusen entwickeltes generelles Differenzierungskonzept zugrunde (15,16). Demnach sind verschiedene Differenzierungsschritte in Zellen durch die Expression von spezifischen molekularen Strukturen auf deren Oberfläche gekennzeichnet. Da es sich um typische zelluläre Oberflächenkomponenten handelt, sollten sich diese unter Ausnutzung ihrer antigenen Eigenschaften mit geeigneten Antisera identifizieren, definieren und letztlich auch isolieren und biochemisch charakterisieren lassen. Für antigene Strukturen, deren Expression in einem Individuum auf einen bestimmten oder einige wenige Zelltypen beschränkt ist, und die eine bestimmte Entwicklungsphase der Zellen signalisieren, wurde der Begriff "Differenzierungsantigene" geprägt (15).

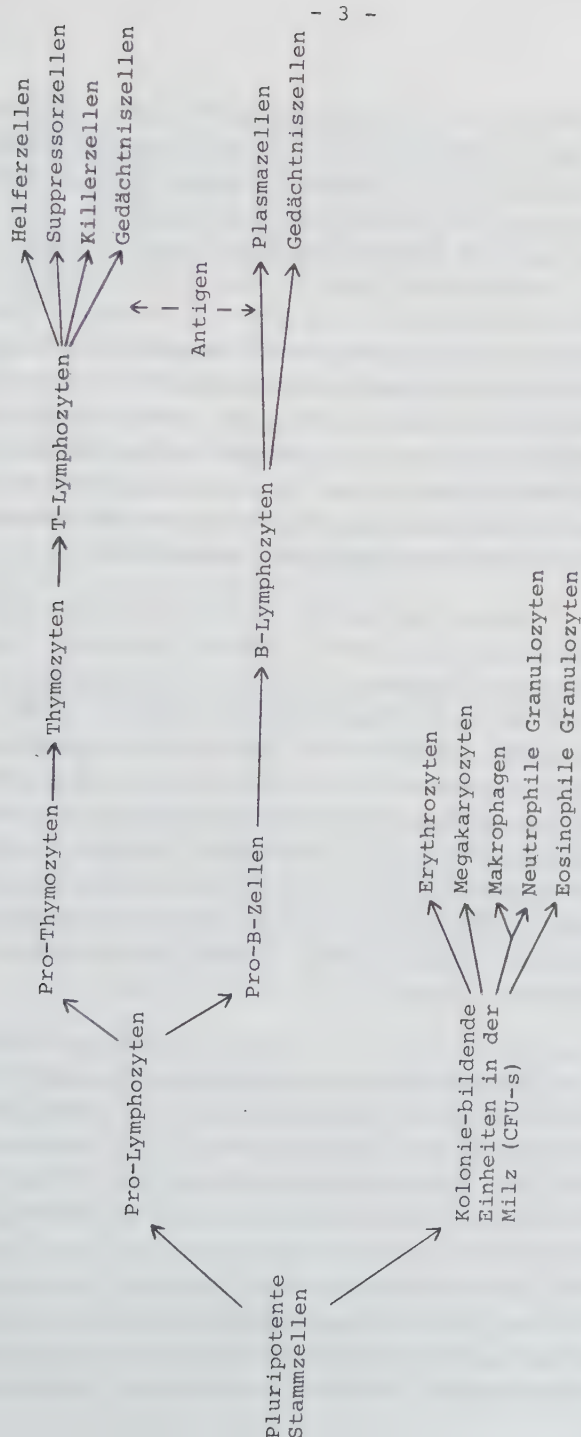


Abb. 1: Genealogie von Lymphozyten

Über die Funktion der Differenzierungsantigene kann man bisher nur Vermutungen anstellen. Möglicherweise handelt es sich um spezielle Syntheseprodukte der Zelle analog den Immunglobulinen, oder um Rezeptoren für Hormone, oder aber um Membran-gebundene Enzyme, die eine spezialisierte Aufgabe haben. Darüberhinaus sind auf der Zelloberfläche exprimierte Komponenten denkbar, die für die Zell-Zell- und schließlich für die Gewebeerkenkung verantwortlich sind (17). Wenn auch die physiologischen Funktionen der Differenzierungsantigene noch unbekannt sind, so sind sie doch von vorzüglichem Wert für die Analyse des Differenzierungsprozesses von Immunzellen, da sie die Isolierung von T- und B-Zellen sowie von Subpopulationen der beiden Zellklassen mit großer Selektivität und Spezifität ermöglichen.

Die bisher an Mammaliazellen am besten charakterisierten Differenzierungsantigene sind in Mäusen bestimmter Inzuchtstämme beschrieben worden und werden als Alloantigene bezeichnet. Für das betreffende Antigen negative Tiere exprimieren gewöhnlich, jedoch nicht immer, ein Alternativantigen, welches durch ein anderes Allel des gleichen Gens kodiert wird. Tiere mit unterschiedlichen Allelen können gegen das Produkt des Alternativallels Antikörper, sog. Alloantikörper, bilden. Der Polymorphismus dieser Antigene ist von großer molekularbiologischer Bedeutung, da er genetische Analysen des betreffenden Antigensystems erlaubt (z.B. Erbgang und Chromosomenlokalisation).

Für die Charakterisierung von Differenzierungsantigenen spielten solche Mäusestämme eine Rolle, welche sich nur in einem einzigen Genlocus voneinander unterscheiden und daher koisogen genannt werden. Das Auftreten einer Punktmutation in einem Inzuchtstamm kann als Grundlage zum Aufbau eines koisogenen Stammes dienen. Ein nur teilweise koisogener Stamm kann durch ausgewählte Zuchtverfahren erhalten werden (18). Diese haben zum Ziel, das Allel x eines Donorstammes in einen ingezüchteten Mäusestamm, der das Allel y trägt und als Basisstamm bezeichnet wird, einzukreuzen, und dadurch dessen Allel y durch das Donorallel zu ersetzen.

Der resultierende Mäusestamm unterscheidet sich dann von dem Basisstamm nicht nur im betreffenden Locus, sondern auch in Chromosomensegmenten unbekannter Länge zu beiden Seiten des betreffenden Locus (19). Diese Stämme werden aufgrund der nur unvollkommenen Koisogenität als kongene Mäusestämme bezeichnet.

Der zytotoxische Test hat sich als serologische Technik zur Charakterisierung von zellulären Oberflächenantigenen besonders bewährt (20). Die Zellen, deren Antigenprofil untersucht wird, werden mit einem entsprechenden Antiserum und Komplement inkubiert. Spezifische Antikörper, welche an das zugehörige Antigen auf der Zelloberfläche binden, können das Komplementsystem aktivieren und dadurch die Lyse der Zellen durch Komplement vermitteln.

2. Differenzierungsantigene auf T-Lymphozyten

Im folgenden sollen für die weitere Argumentation wichtige Differenzierungsantigene, die mit Hilfe der Immungenetik charakterisiert werden konnten, kurz beschrieben werden (Tab. 1, Abb. 2). Dabei wird in besonderem Maße auf Antigen-systeme eingegangen, welche Entwicklungsstadien von T-Zellen kennzeichnen. Darüberhinaus wird das System der klassischen Transplantationsantigene (H-2-Antigene bei der Maus), welches auf praktisch allen Körperzellen exprimiert ist, kurz erläutert.

Thymozyten entwickeln sich aus Vorläuferzellen, den Pro-Thymozyten, die im erwachsenen Tier hauptsächlich in Knochenmark und Milz vertreten sind (7,22) und keine der klassischen Thymozytenantigene exprimieren (TL^- , $Thy-1^-$, Lyt^-). Sie tragen, ebenso wie andere Körperzellen auch, auf ihrer Oberfläche die serologisch definierten Histokompatibilitätsantigene H-2K und H-2D, die in der K- bzw. D-Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex oder MHC) der Maus auf Chromosom 17 kodiert werden (23). H-2K- und H-2D-Antigene sind extrem polymorph, d.h.

Tabelle 1: Alloantigensysteme auf Mauszellen

	H-2	TL	Thy-1	Lyt-1	Lyt-2 Lyt-3	Qa	Ia
Chromosom	17	17	9	19	6	17	17
Thymozyten	+	+	+	+	+	+	±
Periphere T-Lymphozyten	+	-	+	+	+	+	±
B-Lymphozyten und Plasma- zellen	+	-	-	-	-	-	+
Epidermiszellen	+	-	+	-	-	nb	+
Spermien	+	-	-	-	-	nb	+
Gehirnzellen	+	-	+	-	-	-	-

nb = bisher nicht bestimmt

sie kommen in vielen Alternativallelen vor.

Pro-Thymozyten differenzieren im Thymus zu den cortikalen Thymozyten, welche in der Thymusrinde lokalisiert sind und etwa 90 bis 95 % der Thymozytenpopulation ausmachen (24). Cortikale Thymozyten sind aufgrund der Anwesenheit spezifischer Oberflächenantigene (TL^+ , $Thy-1^+$, Lyt^+) von Pro-Thymozyten zu unterscheiden.

Das TL (Thymus-Leukämie)-Antigensystem (25,26), welches von Genen auf Chromosom 17 kodiert wird (27), kommt nur auf den cortikalen Thymozyten von manchen Mäusestämmen (TL^+ -Stämme) und auf manchen T-Zelleukämien vor. Damit kennzeichnet es einen bestimmten Schritt in der T-Zelldifferenzierung.

Ein weiterer, während der T-Zelldifferenzierung neu auftretender Marker ist das Thy-1 (Thymus-1)-Antigen (28), welches wegen seiner Abwesenheit von B-Lymphozyten als hauptsächliches Unterscheidungskriterium zwischen T- und B-Zellen dient

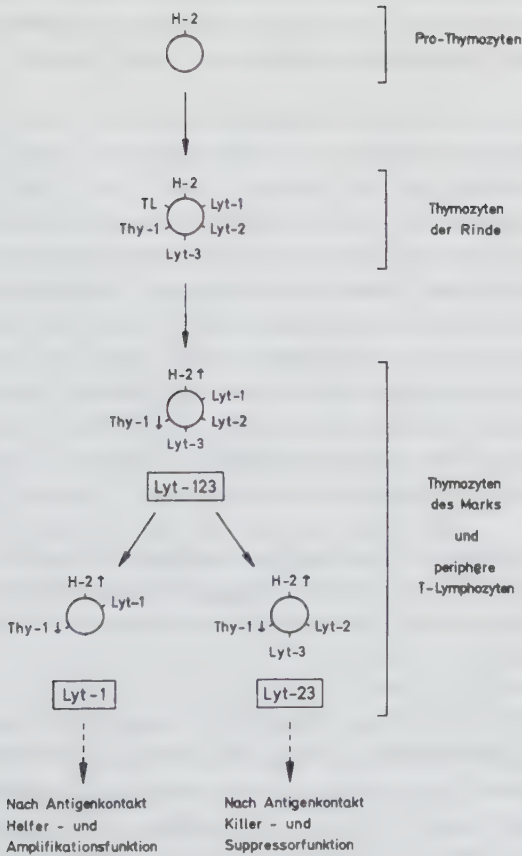


Abb. 2: Modell der T-Zelldifferenzierung (nach Ref. 21)

(29). Allerdings ist die Expression dieses Markers nicht auf T-Zellen beschränkt, sondern auch für Gehirn (28)- und Epidermiszellen (30) charakteristisch. Der Thy-1-Locus tritt in zwei alternativen Allelen mit zwei phänotypisch unterschiedlichen Genprodukten auf, Thy-1.1 und Thy-1.2.

Die Antigene des Lyt-Systems sind, soweit bisher bekannt ist, in ihrer Repräsentation ebenfalls auf T-Zellen beschränkt. Jeder der drei Genloci Lyt-1 (31) auf Chromosom 19 (32), Lyt-2 (31) und Lyt-3 (33) auf Chromosom 6 (34) besteht aus zwei Allelen a und b, welche für zwei alternative Alloantigene 1 und 2 kodieren. So sind z.B. den beiden Allelen Lyt-1^a und Lyt-1^b des Lyt-1-Locus die Antigene Lyt-1.1 und Lyt-1.2 zuzuordnen. Der Lyt-2- und der Lyt-3-Genlocus sind so nahe benachbart, daß bisher in entsprechenden Kreuzungen kein crossing-over zwischen beiden Loci beobachtet wurde (34). Ihre Genprodukte scheinen jedoch separate individuelle Moleküle darzustellen (35). Sowohl Lyt-2.1 als auch Lyt-3.1 wurden bereits als Antigendeterminanten auf Glykoproteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 35.000 Dalton charakterisiert (36). Dagegen scheint Lyt-1.1 mit einem Glykoprotein von 67.000 und/oder 87.000 Dalton assoziiert zu sein (37).

Daß sich die cortikalen Thymozyten wahrscheinlich aus Pro-Thymozyten entwickeln, wurde auch aus in vitro-Experimenten abgeleitet, im Verlauf derer aus Pro-Thymozyten aus Knochenmark und Milz Zellen entstanden, welche die gleichen Oberflächenantigene wie die cortikalen Thymozyten besaßen. (38,39). Der Differenzierungsschritt Pro-Thymozyt zu cortikalem Thymozyt konnte in vitro in einer zweistündigen Kultur (40) selektiv durch das Polypeptidhormon Thymopoietin (41) induziert werden (42 - 44). Es wurde daher gefolgert (45), daß in der kurzen Zeitspanne von zwei Stunden in einem Prozeß, welcher Transkription von DNA und Translation von RNA, jedoch keine Replikation von DNA benötigte (46), verschiedene Gene auf mehreren Chromosomen aktiviert wurden, was schließlich zur Expression von neuen zellulären

Oberflächenantigenen wie TL, Thy-1, Lyt-1, Lyt-2, Lyt-3 u.a. führte. Die Pro-Thymozytenkonversion kann aber nicht nur mit Thymopoietin, dem aus Thymus isolierten, wahrscheinlich physiologischen Induktor, eingeleitet werden, sondern auch mit anderen stimulierenden Agentien wie Endotoxin oder c-AMP, wie von M.P. Scheid gezeigt werden konnte (39). Dieser Befund wiederum wurde dahingehend interpretiert, daß der Pro-Thymozyt dazu programmiert oder determiniert ist, nach Kontakt mit einem geeigneten Induktor seine physiologische Differenzierung zu einem cortikalen Thymozyten in vitro fortzusetzen (45). Diese Erkenntnis der Determination bzw. der programmierten Differenzierung stünde auch im Einklang mit Ergebnissen anderer Experimente wie z.B. der Induktion von kleinen, sich nicht teilenden Lymphozyten zu Proliferation und Differenzierung in Plasmazellen bzw. funktionell aktiven T-Lymphozyten durch unspezifische B (47)- bzw. T (48)-Zellmitogene, welche Antigen, den spezifischen Induktor, zu ersetzen vermögen.

5 - 10 % der Thymozyten sind im Mark des Thymus, der Medulla, lokalisiert. Während die Mehrzahl der cortikalen Thymozyten in Gegenwart von Cortison absterben (49), erweisen sich die Thymozyten der Medulla als Cortison-resistent und können daher aufgrund dieser Eigenschaft in angereicherter Form erhalten werden (50). Im Gegensatz zu cortikalen Thymozyten, welche, soweit heute bekannt ist, keine immunologischen Funktionen innehaben (51) und daher als "unreife" Thymozyten bezeichnet werden, gleichen die Thymozyten des Marks, die "reifen" Thymozyten, in ihrer Immunkompetenz den peripheren T-Lymphozyten (51,52). Die medullären Thymozyten repräsentieren eine neue Phase im Differenzierungsprozeß von T-Zellen, wobei jedoch ungeklärt ist, ob sich die medullären direkt von den cortikalen Thymozyten ableiten (53), oder ob im Thymus mehrere parallele Entwicklungswege von T-Zellen nebeneinander vorliegen (54).

Ein neues Oberflächenantigenprofil kennzeichnet die

Differenzierungsstufe der medullären Thymozyten. Dieses wird auch von den peripheren T-Lymphozyten beibehalten. Der TL-Marker ist nicht mehr nachweisbar (50). Die Dichte des Thy-1-Antigens ist stark reduziert (55), während die H-2-Antigene in erhöhter Konzentration auftreten (56). Hinsichtlich der Expression von Lyt-Antigenen können drei Kategorien unterschieden werden, wie man zunächst an Mäusen des Stammes C57BL/6 zeigen konnte (57). Etwa 50 % der peripheren T-Lymphozyten (Milz- und Lymphknotenzellen vereint) tragen alle drei Antigene, d.h. sie sind $TL^{-}:Lyt-1^{+}2^{+}3^{+}$ (Lyt-123). Ungefähr 30 % sind $TL^{-}:Lyt-1^{+}2^{+}3^{-}$ (Lyt-1) und rund 7 % sind $TL^{-}:Lyt-1^{-}2^{+}3^{+}$ (Lyt-23). Die Klassifizierung der T-Zellen mit Hilfe des Kriteriums selektiver Lyt-Expression in mindestens drei Unterklassen (Subpopulationen, Subsets) wurde aus Experimenten gewonnen, in denen die Zellen zuerst mit einem Lyt-Antiserum (z.B. anti-Lyt-1) und mit Komplement behandelt wurden. Ein Teil der überlebenden Zellen konnte daraufhin mit anti-Lyt-2-Serum und Komplement lysiert werden. Der Prozentsatz der im zweiten Schritt mit anti-Lyt-2-Serum und Komplement lysierten Zellen war kleiner als der Prozentsatz toter Zellen, welcher resultierte, wenn eine nicht-vorbehandelte Zellsuspension mit anti-Lyt-2-Serum und Komplement behandelt worden war (57). Dieses Ergebnis legte die Annahme der Existenz von mindestens drei phenotypisch verschiedenen T-Zellsubpopulationen nahe.

Eine entsprechende Kompartimentierung der T-Zellpopulation in drei Subklassen wurde auch für Thymozyten der Medulla gefunden (57). Ungeklärt ist noch, ob sich die Subpopulationen Lyt-1 und Lyt-23 sequentiell von Lyt-123-Zellen ableiten, oder ob im Thymus divergente Differenzierungswege zum parallelen Entstehen der drei Populationen führen (58). Neuere Untersuchungen von McDougal et al. (59) an einer Cortison-resistenten Thymozytenpopulation lassen es als möglich erscheinen, daß immunologisch kompetente Lyt-1-Zellen aus Lyt-123-Zellen hervorgehen können. Lyt-1- und Lyt-23-Zellen sind wahrscheinlich Produkte divergenter Differenzierungswege. Wenn isolierte

Lyt-1- oder Lyt-23-Zellen jeweils getrennt in Mäuse transferiert werden, die infolge eines experimentellen Eingriffs kein eigenes T-Zellsystem mehr besitzen, so wandeln sich beide Subpopulationen nicht ineinander um (60).

Durch die Berücksichtigung zusätzlicher Oberflächenmarker ist nun eine weitergehende Unterteilung der Lyt-Subpopulationen möglich. Das von T. Stanton und E.A. Boyse entdeckte Qa-1 System (61), dessen Genlocus dem TL- und H-2D-Locus auf Chromosom 17 benachbart ist, wird in $Qa-1^+$ -Mäusen (Genotyp $Qa-1^a$) auf Thymozyten und Subklassen von T-Lymphozyten exprimiert. In Lymphknoten der bisher untersuchten Mäuse tragen rund 60 % der Lyt-1-Population und über 80 % der Lyt-123-Population dieses Antigen auf der Zelloberfläche (62). Über die Expression von Qa-1 auf Lyt-23-Zellen herrscht momentan noch Unklarheit. In Mäusen mit $Qa-1^b$ -Genotyp ist bislang noch keine alloantigene Determinante gefunden worden (63).

Schließlich ist es möglich, T-Zellsubpopulationen mit Hilfe der Ia (I-Region-assoziierte)-Antigene (64-66) weitergehend zu charakterisieren. Ia-Antigene werden von mehreren Subregionen der I-Region innerhalb des H-2-Komplexes auf Chromosom 17 bei der Maus kodiert (67). Wie H-2K und H-2D zeigen auch Ia-Antigene ausgeprägten Polymorphismus. Es handelt sich wie bei den klassischen Transplantationsantigenen H-2K und H-2D um Glykoproteine, die seit kurzem einer detaillierten biochemischen Analyse zugänglich geworden sind. Außer auf bestimmten T-Zellsubpopulationen (68) sind diese Antigene hauptsächlich auf B-Zellen (69), daneben auch auf Makrophagen, Epidermiszellen und Spermien exprimiert (70,71).

3. Funktionelle Eigenschaften der Lyt-Subpopulationen

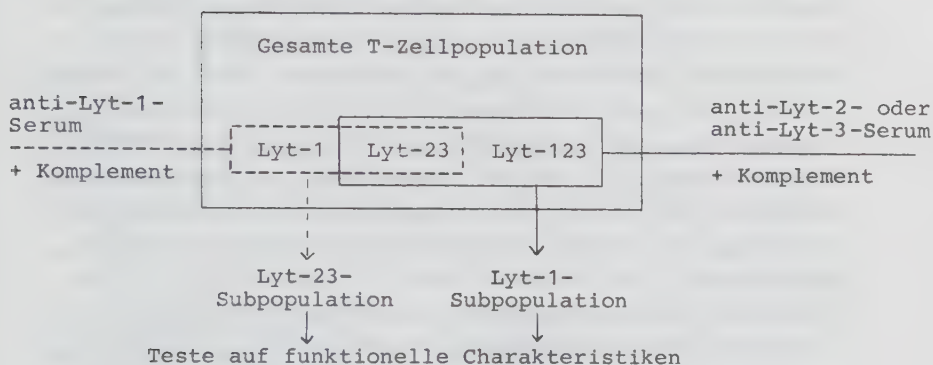
In den letzten Jahren gelang es, in einer Reihe von Arbeiten zu demonstrieren, daß die drei Lyt-Subsets Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123 sowie deren Untergruppierungen offenbar dazu determiniert sind, ihnen eigene Immunfunktionen auszuüben (3). Diese Erkenntnisse wurden aus Experimenten gewonnen, in denen isolierte T-Zellsubpopulationen in funktionellen Testen auf ihr Verhalten hin untersucht wurden. Prinzipiell lassen sich im experimentellen Vorgehen bei der Untersuchung von Immunfunktionen zwei Schritte voneinander unterscheiden:

- i) eine Phase der Zellsensibilisierung, während der Vorläuferzellen durch Antigen zu Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen induziert werden,
- ii) der eigentliche Funktionstest, welcher qualitative und eventuell auch quantitative Aussagen über die Aktivität der entstandenen Effektorzellen gestattet.

Zur Charakterisierung des Lyt-Phänotyps von Vorläufer- und Effektorzellen wurden die Zellen in angereicherter, isolierter Form eingesetzt. Ein Verfahren zur Isolierung der T-Zellsubpopulationen Lyt-23 und Lyt-1 veranschaulicht Abb. 3. T-Lymphozyten werden entweder mit anti-Lyt-1-Serum und Komplement (linke Seite der Abbildung) oder mit anti-Lyt-2- oder anti-Lyt-3-Serum und Komplement (rechte Seite der Abbildung) behandelt, wodurch die Populationen Lyt-23 bzw. Lyt-1 selektiv erhalten werden können (57,72,73).

Lyt-23-Zellen konnten bisher mit Hilfe funktioneller Charakteristiken in zwei Subgruppen weiter aufgegliedert werden. Diejenigen Lyt-23-Zellen, welche der ersten Subgruppe angehören, haben zytotoxische Aktivität (57,73). Sie sind in der Lage, als "fremd" erkannte Zellen spezifisch zu eliminieren. Dabei kann es sich bei den Zielzellen entweder um allo genetische Zellen handeln, die sich von den zytotoxischen Killerzellen im H-2-Komplex unterscheiden, oder

Abb. 3: Isolierung der Lyt-Subklassen Lyt-23 und Lyt-1
(nach Ref. 3)



um modifizierte syngenetische Zielzellen, auf deren Oberfläche z.B. virales Fremdantigen exprimiert ist. Letztere können von den Killerzellen nur in Verbindung mit H-2-Strukturen unter restringierten Bedingungen erkannt werden (H-2-Restriktion, Ref. 74). Die funktionellen Aktivitäten dieser Lyt-23-Zellpopulation können in vitro mit dem Zell-vermittelten Zytotoxizitätstest (cell-mediated lysis oder CML) getestet und quantifiziert werden (75). Auf den zytotoxischen Effektorzellen wie auch auf deren Vorläufern lassen sich keine Ia-Antigene nachweisen (76).

Eine zweite Subgruppe der Lyt-23-Population besitzt die Fähigkeit, sowohl humorale (77,78) als auch Zell-vermittelte (78,79) Immunantworten zu supprimieren. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Suppression der Antikörperbildung mittelbar über die beteiligten T-Helferzellen erfolgen kann (80). Die die Antikörperbildung verhindernden Suppressoreffektorzellen, jedoch nicht deren Vorläuferzellen, tragen Ia-Antigene auf ihrer Oberfläche (81 - 83). Sowohl Killer (84)- als auch Suppressorzellen (85)

erkennen Antigen in Verbindung mit H-2K/D-Strukturen der Zielzellen.

Neben den Lyt-23-Zellen gelang es bisher, Lyt-1-Zellen als diskrete T-Zellpopulation mit für diese Population charakteristischen Funktionen zu identifizieren. Lyt-1-Zellen kooperieren mit anderen Zellen (B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen), um deren Funktionen zu ermöglichen oder gar zu verstärken, wenn sie durch Antigen in Verbindung mit Strukturen der I-Region stimuliert werden (86). So induzieren sie B-Lymphozyten zu Antikörperproduktion in der humoralen Immunantwort in vitro (Helferfunktion, Ref. 57,72,81,87), amplifizieren sie die Entstehung von alloreaktiven zytotoxischen Lyt-23-Effektorzellen aus Pro-Killerzellen in vitro (Amplifikationsfunktion, Ref. 88-90) und aktivieren sie Makrophagen und Monozyten in der Reaktion vom verzögerten Typ in vivo (delayed-type hypersensitivity oder DTH, Ref. 91). Außerdem besitzen Lyt-1-Zellen die Eigenschaft, im in vitro-Testsystem der gemischten Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte culture, MLC, oder mixed lymphocyte reaction, MLR, Ref. 92) in Reaktion auf solche Stimulatorzellen zu proliferieren, die sich von ihnen in der I-Region des H-2-Komplexes unterscheiden. Experimente aus den Arbeitsgruppen um H. Cantor und R. Gershon demonstrieren eine weitere Funktion von Lyt-1-Zellen (94). Isolierte Lyt-1-Zellen, welche mit einer hohen Dosis Schafserythrozyten in vivo oder in vitro sensibilisiert worden waren, können nach Transfer zu unbehandelten Milzzellsuspensionen Lyt-123-Zellen induzieren, Antigen-spezifisch an der Suppression einer Antikörperantwort mitzuwirken. Die entstandenen Suppressorzellen verhindern wahrscheinlich die Hilfe von T-Helferzellen für B-Lymphozyten bei der humoralen Immunantwort. Dieser Effekt wurde als Rückkopplungs-Suppression bezeichnet (feedback suppression, Ref. 94). Eine detaillierte Analyse dieses Befundes ergab, daß für die Fähigkeit, Suppressorzellen zu induzieren, Zellen einer Untergruppe der Lyt-1-Subpopulation, nämlich Lyt-1:Qa-1-Zellen, verant-

wortlich waren (83).

Lyt-123-Zellen können mit heutigen Methoden noch nicht direkt isoliert werden, sodaß die Zuordnung von Funktionen zu dieser T-Zellpopulation nur indirekt erfolgen kann. Wenn eine T-Zellfunktion von einer Kombination aus gereinigten Lyt-1- und Lyt-23-Zellen nicht erbracht werden kann, so wird diese Funktion vorbehaltlich der in der Kombination fehlenden Lyt-123-Population zugeschrieben. Durch diese indirekte Schlußfolgerung wurden Lyt-123-Zellen in unterschiedlichen Testsystemen als Vorläuferzellen der beiden anderen Subklassen Lyt-23 und Lyt-1 impliziert. Als Beispiel kann die Entstehung von zytotoxischen Lyt-23-Zellen, welche gegen modifizierte, syngenetische Zellen gerichtet sind (96) angeführt werden. Ergebnisse von Tada et al. (97) weisen jedoch darauf hin, daß Lyt-123-Zellen auch andere Funktionen neben ihrer Rolle als Vorläuferzellen haben können. Dieser Gruppe gelang es, aus Lyt-123-Lymphozyten einen Suppressor-Amplifikationsfaktor zu isolieren, der bei der Antigen-spezifischen Inhibition der sekundären Immunantwort gegen lösliche Antigene beteiligt war (98).

Auch im Menschen (99,100) ist es inzwischen gelungen, mit Hilfe spezifischer Antiseren die T-Zellklasse in zwei Subpopulationen zu unterteilen (101). Beiden Subpopulationen werden spezialisierte Funktionen zugeschrieben. Während die eine in der gemischten Lymphozytenkultur reaktiv ist, zeichnet sich die andere durch Killeraktivität aus (101).

Aus diesem geschilderten, kurzen Überblick wird deutlich, daß Zellen verschiedener T-Zellsubpopulationen miteinander in Wechselwirkung treten können, um flexibel der Forderung nach optimaler Immunreaktivität gerecht zu werden.

4. Untersuchung der mutanten hr/hr-Mäuse

Die enge Korrelation zwischen Lyt-Phänotyp einer T-Zelle und deren Funktion in vitro (3) läßt vermuten, daß sowohl für die Ausprägung der Lyt-Antigene als auch für die Funktion der Lyt-Subpopulationen die Aktivierung bestimmter Gene notwendig ist. Demnach wären Mutationen zu erwarten, die beide Variablen beeinflussen und zu erblichen immunologischen Störungen führen. Diese könnten dadurch gekennzeichnet sein, daß Defekte oder Variationen in bestimmten T-Zellfunktionen mit Änderungen in der Repräsentation der einen oder anderen definierten Lyt-Subklasse einhergehen.

Wie bei anderen biologischen Systemen, z.B. in der Bakteriengenetik, bietet das Studium von spontan entstandenen Mutationen einen wichtigen Zugang zu dem Verständnis von Entwicklung und Funktion des Immunsystems. In der Maus wurden mehrere Mutationen, die das Immunsystem beeinflussen, als Modelle intensiv untersucht. Dazu gehören u.a. die nackte Maus (nu/nu, Ref. 102), die weder einen Thymus noch reife T-Lymphozyten und damit T-Zellfunktionen besitzt, während die B-Zellen intakt sind (103). Dagegen haben Mäuse des CBA/N-Stammes, die die Mutation xid (X-linked immunodeficiency) tragen, normale T-Zellen, enthalten aber die reiferen Formen der B-Zellreihe (104). Eine Mutation am LPS-Locus bewirkte in C3H/HeJ- und C57BL/10.Sc.Cr.-Mäusen, daß deren B-Zellen durch hochgereinigtes Lipopolysaccharid nicht stimuliert werden können (105,106). Mit Hilfe dieser mutanten Mäuse konnten Antiseren gegen den LPS-Rezeptor auf der Oberfläche von LPS-Respondermäusen erhalten werden (107), die schließlich die Isolierung und biochemische Charakterisierung des Rezeptors erlauben werden. Generell ist die Untersuchung von Mausmodellen mit einer Mutation x in einzelnen Genen besonders vorteilhaft, da meistens heterozygote +/x- und homozygote ++ (Wildtyp)-Kontrollmäuse für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit Mäuse des HRS-Stammes, die die Mutation *hr* (hairless) tragen, zur Grundlage unserer Untersuchungen gemacht. Diese Mutante, die haarlose Maus (*hr/hr*), fiel dadurch auf, daß von dem Alter von 12 - 14 Tagen an am Kopf beginnend Haarverlust auftrat. Man hatte zeigen können, daß nach einem normalen, ersten Haarzyklus aufgrund einer defekten Haarpulpa die Bildung eines neuen Haares nicht mehr initiiert wird (108). Aufgrund von Ergebnissen aus Kreuzungsexperimenten wurde *hr* als autosomale, rezessive Mutation dem Chromosom 14 zugeordnet (109).

Der Ursprung des HRS-Stammes geht auf das Jahr 1926 zurück, als in London eine haarlose Wildmaus eingefangen wurde. Die männliche Maus wurde mit genetisch nicht definierten Mäusen gepaart und die Töchter wurden zum Vater zurückgekreuzt. Auf diese Weise ergaben sich haarlose *hr/hr*- und behaarte *+hr*-Tiere. 1952 wurde eines der resultierenden haarlosen Männchen in den Jackson Laboratories mit BALB/c-Weibchen gekreuzt. Die Töchter wurden wiederum zum Vater zurückgekreuzt. Die folgende Bruder-Schwester-Kreuzung wurde nun beibehalten und dann über mehr als 60 Generationen fortgesetzt (H.J. Heiniger, The Jackson Laboratories, pers. Mitteilung). Damit sind die Genotypen *hr/hr* und *+hr* kongen in Bezug auf die Genregion um den *hr*-Locus.

Ein Stamm von *+/-*-Mäusen kann durch Paarung zweier heterozygoter (*+hr*) Mäuse abgeleitet werden. Diese Kreuzung ergibt zu 25 % behaarte *+/+*-Nachkommen. *+/-* und *+hr*-Tiere lassen sich jedoch phänotypisch nicht unterscheiden. Die Selektion der gewünschten Zuchttiere erfolgt aufgrund der Ergebnisse von Testkreuzungen. Wenn in mehreren Kreuzungen der behaarten Tiere unbekannten Genotyps mit *hr/hr*- oder *+hr*-Mäusen keine unbehaarten Nachkommen auftreten, so besitzt die fragliche Maus mit großer Wahrscheinlichkeit den Genotyp *+/+*.

Homozygote hr/hr-Mäuse entwickeln zu einem hohen Prozentsatz lymphozytäre Leukämie. So sind im Alter von 8 Monaten 45 % der hr/hr-Tiere im Gegensatz zu 1 % der +/hr-Geschwister von dieser Krankheit betroffen. Mit 18 Monaten weisen 70 % von hr/hr- und 20 % von +/hr-Tieren diese Störung auf (111). Wegen des Vorhandenseins von Kontrollgeschwistern könnten sich hr/hr-Mäuse auch als Modell zum Studium genetischer Faktoren in der Leukämieentwicklung gegenüber anderen bekannten Stämmen mit hoher Leukämierate wie z.B. AKR, C58 etc. als überlegen erweisen.

In der Literatur war berichtet worden, daß haarlose hr/hr-Mäuse im Gegensatz zu Kontrollmäusen in verschiedenen Testsystemen altersabhängig Immundefizienzen zeigten (112). So war der Antikörpertiter gegen Tetanustoxoid in 6 Monate alten hr/hr-Tieren gegenüber +/hr-Geschwistern reduziert, jedoch nicht in 2 Monate alten Tieren (112). Außerdem war in hr/hr-Mäusen eine maximale Reaktion vom verzögerten Typ (DTH) gegen Picrylchlorid im Alter von $2\frac{1}{2}$ Monaten beobachtet worden, welche in älteren Mäusen nach $3\frac{1}{2}$ Monaten nicht mehr nachweisbar war. +/hr-Kontrolltiere dagegen entwickelten eine maximale DTH mit $3\frac{1}{2}$ Monaten (L. Schultz, The Jackson Laboratories, pers. Mitteilung).

Es schien daher möglich, daß den gestörten Immunantworten in hr/hr-Mäusen ein Defekt in einer oder in mehreren T-Zellsubpopulationen zugrunde liegt. Somit bestand die Chance, daß Mäuse des HRS-Stammes als in vivo-Modell dafür dienen konnten, daß infolge der Mutation serologisch wie auch funktionell erfassbare Änderungen im T-Zellkompartiment vorliegen.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde in hr/hr-Mäusen nach Defekten in der Repräsentation der T-Zellsubpopulationen Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123 und den ihnen zukommenden Funktionen gesucht.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Reagentien und Tiere

1.1 Kulturmedien, Puffer, Lösungen

Für alle serologisch-analytischen Arbeiten wurde Medium 199 (M199 von Gibco, Long Island, N.Y., USA) verwendet.

Alle in vitro-Zellkulturen erfolgten in einem Basismedium, dem je nach Bedarf verschiedene Reagentien zugesetzt wurden. Das Basismedium bestand aus: 100 ml RPMI-1640, 1 ml L-Glutamin (200 mM), 1 ml HEPES (N-2-Hydroxy-Äthyl-Piperazin-N-2'-Äthan-Sulfonsäure, 2 M) und 2 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (5000 E Penicillin, 5000 µg Streptomycin/ml) (alle Reagentien von Gibco). Die für verschiedene Kultursysteme verwendeten zusätzlichen Reagentien sind bei der Beschreibung der einzelnen Kultursysteme aufgeführt.

Den mit Schafserythrozyten stimulierten Zellen sowie den Kulturen zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten wurden täglich (Tag 0 - 4) 0,1 ml folgenden Nährmedien (113) zugegeben: 83,2 ml RPMI-1640, 8,0 ml essentielle Aminosäuren (50X, Gibco), 3,3 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100X, Flow, Irvine, Schottland), 5,5 ml L-Glutamin (200 mM), 1,0 g D-Glucose. Der pH dieses Mediums wurde mit 1 N NaOH auf einen Wert von 7,2 eingestellt. Nach Zugabe von Penicillin und Streptomycin (100 E/ml bzw. 100 µg/ml) wurde das Medium sterilfiltriert und bei -20°C in Aliquoten tiefgefroren aufbewahrt. Vor der Verwendung in den Zellkulturen wurde dieses Medium mit Hitze-inaktiviertem (56°C, 30 Min.) fötalem Kälberserum (FCS, Microbiological Associates, Bethesda, Md., USA) im Volumenverhältnis 6:1 (SRBC-stimulierte Kulturen) bzw. 3:1 (Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten versetzt. Das fertige Nährmedium wurde bis zur sequentiellen Zugabe zu den Kulturen an den Tagen 1 - 4 bei -20°C gelagert.

Minimales essentielles Medium (Eagle's) mit Earle's Salzen (MEM, Gibco), das 30 mM HEPES, 100 E/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % FCS enthielt, wurde speziell im Zell-vermittelten Zytotoxizitätstest verwendet.

<u>Balancierte Salzlösung (BSS)</u>	g/l
Glukose	1,00
KH_2PO_4	0,06
Na_2HPO_4	0,19
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,186
KCL	0,40
NaCl	8,00
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20
Phenolrot	0,01

wurden in Aqua bidest. gelöst.

Der pH-Wert dieser Pufferlösung war 7. Sie wurde durch Sterilfiltration sterilisiert.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) g/l

K_2HPO_4	13,4
KH_2PO_4	3,2
NaCl	85,0

wurden in Aqua bidest. gelöst. Diese Stammlösung (10fach konzentriert) wurde sterilfiltriert und bei Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. PBS, welches 2 % FCS (56°C, 30 Min.), 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt, wurde zum Präparieren von Zellsuspensionen für funktionelle Tests verwendet.

Physiologische Kochsalzlösung

Eine Lösung von 9 g NaCl in 1 l Aqua bidest. (0,15 M).

Veronalpuffer (114)

	g/l
NaCl	8,40
NaHCO ₃	0,25
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,10
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02
Na-Barbiturat	0,30
Barbitursäure	0,46
Glucose	1,00
Rinderserumalbumin	2,00

Diese Pufferlösung wurde für den Protein A-Rosettentest benötigt.

TRIS-Ammoniumchloridlösung zur Lyse von Erythrozyten

Stammlösung A: 20,6 g/l Trizma-Base (Tri-Hydroxy-Methyl-Amino-Methan, Sigma, St. Louis, Mo., USA)

Der pH wurde mit konz. HCl auf pH 7,3 eingestellt.

Stammlösung B: 8,3 g/l NH₄Cl

Vor Gebrauch wurden Aliquote der Stammlösung A und B im Verhältnis 1:9 vereint.

Chromchloridlösung (115)

1 g CrCl₃·6H₂O wurde in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst (0,038 M, 1 %). Der pH wurde mit 1 N NaOH auf 5,0 eingestellt. Während der ersten drei Wochen nach Ansetzen der Lösung veränderte sich der pH, sodaß dieser 3 mal wöchentlich mit 1 N NaOH auf pH 5,0 eingestellt werden mußte. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Trypanblaulösung zur Vitalfärbung (116)

Trypanblaulösung (2g/l, Matheson, Coleman and Bell, Norwood, Ohio, USA) und NaCl-Lösung (21,25 g/500 ml) wurden, um physiologische Bedingungen zu erhalten, im Verhältnis 4:1 gemischt.

1.2 Mäusestämme

Zuchtpaare des Stammes HRS/J waren ursprünglich von The Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA, erhalten worden. Die Bruder-Schwester-Paarung von behaarten heterozygoten Weibchen (+/hr) mit haarlosen homozygoten Männchen (hr/hr) ergab 50 % hr/hr und 50 % +/hr-Nachkommen. Mäuse der Stämme C57BL/6 (B6), B6-Lyt-1.1, B6-Lyt-2.1, Lyt-3.1 B6-H-2^k, A, A-Thy-1.1, A.TH, A.TL und C3H/An stammten aus der Kolonie von Prof. Dr. E.A. Boyse, Sloan Kettering Institute, New York, während alle anderen Mäuse von The Jackson Laboratories bezogen wurden. Tab. 2 gibt einen Überblick über wichtige Charakteristiken der Mäusestämme, die für das Verständnis der Arbeit von Bedeutung sind.

Die kongenen Mäusestämme wurden entsprechend den Empfehlungen von H. Shiku (73) und E.A. Boyse (117) bezeichnet. Für eine alternative Nomenklatur siehe J. Klein (118).

1.3 Antiseren

Die für diese Arbeit benötigten Antiseren wurden von Dr. F.W. Shen, Sloan-Kettering Institute, New York, freundlichweise zur Verfügung gestellt. Details der Antiserenherstellung sind in Ref. 119 beschrieben. In Tab. 3 sind die verwendeten Antiseren zusammengestellt.

1.3.1 Absorption der Antiseren

Kontaminierende Antikörper mußten aus den Seren herausabsorbiert werden. Die zur Absorption verwendeten Zellen (Thymozyten, Milz-, Lymphknoten- und Tumorzellen) wurden 3mal in Medium 199 gewaschen. Danach wurden die Zellen bei 600 g sedimentiert und nach sorgfältigem Abheben des Überstandes in dem zu absorbierenden Serum (nach Bedarf mit M199 verdünnt) resuspendiert. Die Absorption der Seren erfolgte für 30 Min. auf Eis. Aus dem absorbierten Serum wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 600 g entfernt.

Tabelle 2: Allotypische Spezifitäten verschiedener Antigene
der in dieser Arbeit verwendeten Mäusestämme

Mäusestämme	allotypische Spezifitäten				
	H-2- Haplotyp	Thy-1	Lyt-1	Lyt-2	Lyt-3
A	a	2	2	2	2
A.Thy-1.1	a	1	2	2	2
A.TH	t2	2	2	2	2
A.TL	t1	2	2	2	2
AKR	k	1	2	1	1
BALB/c	d	2	2	2	2
B10.S	s	2	2	2	2
B10.T(6R)	y2	2	2	2	2
C3H/An	k	2	1	1	2
C57BL/6	b	2	2	2	2
C57BL/6-Lyt-1.1	b	2	1	2	2
C57BL/6-Lyt-2.1,3.1	b	2	2	1	1
C57BL/6-H-2 ^k	k	2	2	2	2
C58	k	2	2	1	1
CBA	k	2	1	1	2
DBA/2	d	2	1	1	2
HRS	k	2	2	2	2
RF	k	1	2	1	1

Tabelle 3: Aufstellung der verwendeten Antiseren

Antiserum	Rezipient	Zelldonor	Zellen
anti-Thy-1.2	(A-Thy-1.1 x AKR-H-2 ^b) F ₁	A	Leukämie ASL1
anti-Lyt-1.2	C3H/An	Ce	Thymozyten
anti-Lyt-2.2	(C3H/An x B6-Lyt-2.1) F ₁	B6	Leukämie ERLD
anti-Lyt-3.2	C58	Ce	Thymozyten
anti-H-2 ^k	B6	AKR	Leukämie K36

Einzelheiten des Absorptionsvorganges sind für verschiedene Antiseren in Tab. 4 erläutert.

1.3.2 Kontrolle der absorbierten Antiseren

Jedes absorbierte Antiserum wurde im zytotoxischen Test (Einstufentest mit mikroskopischer Auszählung, siehe B. 2.2.1.1) auf Vollständigkeit der Absorption hin getestet. Dazu wurden sowohl Zellen, die das relevante Antigen auf ihrer Oberfläche trugen, als auch solche, die es nicht besaßen, verwendet. Das absorbierte Serum wurde nur dann im Experiment eingesetzt, wenn bei einer Verdünnung von 1:20 keine Lyse der negativen Testzellen erfolgte, die Reaktivität mit positiven Testzellen jedoch erhalten geblieben war. Die Seren wurden in Aliquoten von 0.05 ml oder 0.1ml bei -70°C gelagert.

Eine zusätzliche Spezifitätskontrolle wurde mit dem anti-Lyt-1.2-Serum durchgeführt. Je 1 ml Serum wurden bei einer Endverdünnung von 1:10 in M199 mit 5×10^9 Thymozyten von B6- oder B6-Lyt-1.1-Mäusen wie oben beschrieben absorbiert. Ein weiteres Serumaliquot wurde ebenfalls 1:10 endverdünnt und unbehandelt auf Eis belassen. Der Test auf Thymozyten von B6-Mäusen zeigte vollständige Eliminierung der Lyt-1.2-Spezifität durch die B6-Thymozyten. Dagegen blieb die Lyt-1.2-Aktivität des Serums nach Absorption mit B6-Lyt-1.1-Zellen im Vergleich zum nicht-absorbierten, entsprechend verdünnten Serum voll erhalten. Die unterschiedlich behandelten Seren wurden bis zu ihrer Verwendung im Test gegen HRS-Milzzellen bei -70°C gelagert.

1.4 Komplement

Als Komplementquelle diente Serum von speziell selektierten Kaninchen (Stamm New Zealand White), das nach 2-stündigem Stehen bei Raumtemperatur und erfolgter Blutgerinnung gewonnen worden war. Das Kaninchenserum wurde zunächst

Tabelle 4: Darstellung des Absorptionsprozesses zur Gewährleistung der Spezifität von Antiseren

Antiserum	Antiserum- verdünnung in M199	Absorbierende Zellen*)	Zellsediment /Serum (V/V)	Anzahl der Absorptionen	Test auf Thymozyten	
					Antigen-negativer Stamm	Antigen-positiver Stamm
anti-Thy-1.2	1:5	AKR-Leukämie- zellen K36	1:1	2	A-Thy-1.1	A
anti-Lyt-1.2	1:2	B6-Lyt-1.1 CBA, C3H/An DBA	1:1	2	B6-Lyt-1.1	B6
anti-Lyt-2.2	1:2	B6-Lyt-2.1, 3.1 AKR, C3H/An, CBA	1:1	2	B6-Lyt-2.1, 3.1	B6
anti-Lyt-3.2	1:2	B6-Lyt-2.1, 3.1 AKR, RF, C58	1:1	2	B6-Lyt-2.1, 3.1	B6
anti-H-2 ^k	1:4	B6, BALB/c	1:1	1	B6	B6-H-2 ^k

) aus Thmus, Milz und Lymphknoten mit Ausnahme der K36-Tumorzellen (Ascites)

im zytotoxischen Einstufentest (siehe 2.2.1.1) in verschiedenen Verdünnungen von 1:10 bis 1:25 ohne Zugabe von Alloantisera auf die natürliche Lyseaktivität gegenüber Maus-thymozyten und damit auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen Mauszellen (120), sogenannte Heteroantikörper, hin untersucht. Diejenige Serumkonzentration, die im Vergleich zur Antiserumkontrolle keine erhöhte Lyse der Testzellen verursachte, wurde zur Bestimmung der Lyseaktivität auf Zellen getestet, die nun zusätzlich mit anti-Lyt-1.2-Serum inkubiert wurden. Die Kriterien für die Auswahl eines Kaninchenserums als Komplementquelle waren maximale Lyse und hoher 50 %-Endpunkt des Antiserums. Als 50 %-Endpunkt wird diejenige Verdünnung des Alloantiserums bezeichnet, die zur Lyse von 50% der Zellen führt; dieser Wert variiert unter anderem mit der Qualität der Komplementquelle. Gewöhnlich entsprachen 4 - 5 von ca. 20 getesteten Kaninchenseren den gestellten Anforderungen. Die Seren wurden teils gepoolt, teils auch separat gehalten. Da Auftauen und Einfrieren von Komplement dessen Aktivität stark in Mitleidenschaft zieht, wurden die selektierten Kaninchenseren in kleinen Aliquoten zum Einmalgebrauch eingefroren und bei -70°C gelagert.

2. Serologische Untersuchungsmethoden

2.1. Zellsuspensionen

2.1.1 Präparation von Zellen aus Thymus, Milz und Lymphknoten

Für die serologischen Experimente wurden Thymozyten aus Thymus in M199 isoliert. Milz- und Lymphknotenzellen wurden ebenfalls in M199 präpariert, das zusätzlich mit 2 % Hitzeinaktiviertem Immunglobulin-freiem FCS (Gibco) zur Ausschaltung von Kaninchen anti-Mausantikörpern supplementiert worden war. Zur Untersuchung von funktionellen Eigenschaften wurden Milzzellen in PBS gewonnen. Diesem waren 2 % Hitzeinaktiviertes Immunglobulin enthaltendes FCS und 2 % Antibiotikallösung zugesetzt worden. Die lymphatischen Organe wurden entweder mit der Schere fein zerschnitten oder bei steri-

lem Arbeiten zwischen zwei Objektträgern mit aufgerauhtem Ende leicht ausgedrückt. Zellklumpen wurden durch Filtration über Nylogewebe abgetrennt. Die Zellen wurden 1 - 2 mal 10 Min. bei 150 g in der Kühlzentrifuge gewaschen. Danach wurden die Zellsedimente in einem kleinen Volumen Medium resuspendiert, und es wurde die Konzentration der Zellen bestimmt.

2.1.2 Präparation von Tumorzellsuspensionen

Tumor K36 des AKR-Stammes: Dieser spontan entstandene Tumor wurde als Ascites in männlichen AKR-Mäusen transferiert. Alle 7 Tage wurden 5×10^6 Tumorzellen zur Weiterführung der Tumورlinie intraperitoneal in männliche AKR-Mäuse injiziert. Am 7. Tag nach Injektion wurden diese Zellen mit M199 aus der Bauchhöhle der Mäuse herausgespült und zur Absorption von Thy-1.2-Antiserum verwendet.

Tumor RLo⁷ 1 des BALB/c-Stammes: Der Tumor entwickelte sich nach Röntgenbestrahlung einer männlichen BALB/c-Maus. 5×10^6 Tumorzellen wurden alle 10 Tage intraperitoneal in männlichen BALB/c-Mäusen passagiert. Das Ernten der Zellen erfolgte durch Auswaschen der Bauchhöhle mit PBS mit 2 % FCS. Die Tumorzellen wurden 2mal gewaschen, mit ^{51}Cr radioaktiv markiert und als Zielzellen im Zell-vermittelten zytotoxischen Test (siehe B. 3.5) verwendet.

2.1.3 Lyse von Erythrozyten

Erythrozyten wurden durch Behandlung der Milzzellsuspension mit TRIS-Ammoniumchloridlösung (siehe B. 1.1) 5 Min. bei Raumtemperatur lysiert (121). Dieses Verfahren hatte sich für die Milzzellen als schonend erwiesen und hatte auf die Reaktivität der Zellen keinen Einfluß.

2.1.4 Markierung von Zellen mit radioaktivem ^{51}Cr

Gewaschene Zellen wurden für eine halbe Stunde bei 37°C mit $200\ \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (Natriumchromat, New England Nuclear NEN-030-S) pro 30×10^6 Zellen in einem Endvolumen von $0,7\ \text{ml}$ inkubiert (122). Nach einmaligem Waschen der Zellen mit Medium 199 wurden diese in $10\ \text{ml}$ des Mediums resuspendiert und für weitere $30\ \text{Min.}$ bei 37°C belassen. Sie standen nach zwei weiteren Waschschritten als Testzellen im Antikörper-Komplement-abhängigen zytotoxischen Test oder als Zielzellen im Zell-vermittelten Zytotoxizitätstest zur Verfügung.

2.1.5 Bestrahlung von Zellen

Milzzellen wurden unmittelbar vor Ansetzen einer gemischten Lymphozytenkultur mit Hilfe einer ^{137}Cs -Strahlenquelle bestrahlt (Gammacell 40, Atomic Energy of Canada). Die Strahlendosis betrug $2000\ \text{R}$ bei einer Rate von $136\ \text{R/min.}$

2.1.6 Anreicherung von T-Lymphozyten mit Hilfe einer Nylonwollsäule

T-Zellen aus der Milz wurden nach der von Julius et al. beschriebenen Methode angereichert (123). Beim Passieren der Zellsuspension über eine Nylonwollsäule haften Ig-positive Lymphozyten an Nylonwolle, während ein Großteil der Ig-negativen Zellen im Eluat erhalten wird. Die Nylonwolle (Leuko-Pak Leukocyte Filter, Fenwall Laboratories, Deerfield, Ill., USA) wurde $10\ \text{Tage}$ bei 37°C in Aqua bidest. inkubiert, wobei die Waschflüssigkeit 5mal gewechselt wurde. Anschließend wurde die Wolle für $3\ \text{Tage}$ bei 37°C getrocknet. $0,6\ \text{g}$ gewaschene Nylonwolle wurden in eine $12\ \text{ml}$ -Plastikspritze gefüllt und durch Autoklavieren sterilisiert. Vor der Zellseparation wurde die Nylonwolle mit ungefähr $10\ \text{ml}$ Waschmedium (PBS mit $5\ \%$ FCS und $2\ \%$ Antibiotikallösung) gesättigt und $45\ \text{Minuten}$ bei 37°C inkubiert. Die Säule wurde anschließend mit $20\ \text{ml}$ Waschmedium, das auf 37°C

vorgewärmt worden war, gewaschen. Bis zu 1×10^8 Milzzellen (nach Erythrozytenlyse) wurden in einem Volumen von 1 ml tropfenweise auf die Wolle aufgetragen und mit 1 ml Medium in die Wolle hineingespült. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die nicht anhaftenden Zellen mit 20 ml Medium eluiert und durch Zentrifugation wiedergewonnen. Die Ausbeute an eluierten Zellen betrug für HRS-Milzzellen ungefähr 20 % der eingesetzten Zellzahl.

2.1.7 Bestimmung von Zahl und Lebensfähigkeit der Zellen

Die Zahl kernhaltiger Zellen wurde durch Auszählen mit Hilfe eines Mikroskopes und einer Zählkammer nach Neubauer ermittelt. Mit dem Trypanblau-Ausschlußtest (116) wurde die Vitalität der Zellen überprüft. Lebende Zellen schließen Trypanblau aus und erscheinen farblos, während tote Zellen an ihrer Blaufärbung zu erkennen sind.

2.2 Testsysteme zum Nachweis von Lymphozyten-Oberflächenmarkern

2.2.1 Antikörper-Komplement-abhängiger zytotoxischer Test

2.2.1.1 Einstufentest

Dieser Test wurde nach Gorer und O'Gorman (20) mit Modifikationen nach Boyse et al. (116) durchgeführt. Als Medium diente stets M199 und alle Schritte erfolgten auf Eis, wenn nicht anderslautend angegeben. Das Antiserum wurde in 10 x 75 mm Reagenzgläsern aus Glas in Volumina von 0,05 ml seriell verdünnt. 0,05 ml der Testzellsuspension mit 5×10^6 Zellen/ml und 0,05 ml Komplement in einer Verdünnung, welche die Zellen ohne Zugabe von Antiserum nicht lysierte, wurden dazupipettiert. Als interne Kontrolle dienten i) eine Komplementkontrolle (KK), wobei M199 statt Antiserum verwendet wurde, und ii) eine Serumkontrolle, in der M199 das Komplement ersetzte. Im Anschluß an eine

Inkubation von 45 Minuten bei 37°C unter Schütteln in einem Wasserbad wurden die Testgläser auf Eis gestellt. Nach Zupipettieren von 0,1 ml Trypanblaulösung wurde das Verhältnis von toten zu lebenden Zellen durch mikroskopische Auszählung bestimmt. Die prozentuale Antiserum-spezifische Lyse wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spez. Lyse} = \frac{\% \text{ tote Zellen (AS)} - \% \text{ tote Zellen (KK)}}{100 - \% \text{ tote Zellen (KK)}} \times 100$$

2.2.1.2 Zweistufentest

0,05 ml Zellsuspension in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml M199, das mit 2 % Immunglobulin-freiem FCS (56°C, 30 Min.) komplettiert worden war, wurden mit 0,05 ml Antiserum, verdünnt in Dulbecco's PBS (Gibco), für eine halbe Stunde auf Eis gehalten. Nach 1maligem Waschen der Zellen in 2 ml M199 wurden diese in 0,1 ml Komplementverdünnung (in PBS) resuspendiert und eine halbe Stunde lang bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Die Gläser wurden danach auf Eis gestellt. Die parallel angesetzten Komplementkontrollen erhielten PBS mit 2 % Serum von unbehandelten B6-Mäusen anstelle von spezifischem Antiserum, während zu den Antiserumkontrollen das gleiche Medium anstelle von Komplement zugesetzt wurde. In einigen Experimenten wurden zur Auswertung des Testes tote und lebende Zellen mit Hilfe von Trypanblau (0,1 ml) unterschieden und mikroskopisch ausgezählt. In der überwiegenden Zahl der Fälle jedoch wurde die Ausgangszellsuspension mit ^{51}Cr markiert. Die Testbedingungen waren dieselben wie oben angegeben. Die Einwirkung des Komplements wurde durch Zugabe von 1 ml M199 gestoppt, danach wurden die Testsuspensionen zentrifugiert. Die freigesetzte ^{51}Cr -Radioaktivität in 0,7 ml des Zellüberstandes wurde in einem Packard Auto-Gamma-Spektrometer gemessen. Zur Bestimmung der maximal möglichen Freisetzung von ^{51}Cr aus den Zellen wurden diese mit 1,1 ml einer einmolaren HCl-Lösung lysiert. Zur Ermittlung der spezifischen Lyse diente folgende Berechnungsformel:

$$\% \text{ spez. Lyse} = \frac{\text{cpm(AS)} - \text{cpm(KK)}}{\text{cpm(max. Freisetzung)} - \text{cpm(KK)}} \times 100$$

Der Prozentsatz lysierter Zellen lag in den Kontrollen unter 30 %.

2.2.2 Protein A-Rosettentest

Protein A wurde nach der Methode von J. Goding an Schafserythrozyten gekuppelt (115). Schafserythrozyten (innerhalb einer Woche nach der Blutung) wurden 3mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zur Kupplung mit Protein A wurden 0,15 ml gepackte Erythrozyten mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung unter Schütteln suspendiert. Dazu wurden 0,1 ml einer 0,1%igen Protein A-Lösung in physiologischer Kochsalzlösung (Pharmacia, Uppsala, Schweden) tropfenweise zupipettiert. Nach einer Minute wurde die Suspension weiterhin unter Schütteln mit 1 ml einer 0,01%igen CrCl_3 -Lösung tropfenweise versetzt. Nach 5-minütigem Stehen bei Raumtemperatur wurden die Erythrozyten 3mal mit Veronalpuffer gewaschen, um überschüssige Reaktanten zu entfernen. Die Protein A-gekuppelten Erythrozyten konnten als 10 %ige Stammlösung in Veronalpuffer bei 4°C aufbewahrt werden. Sie wurden innerhalb von 7 Tagen nach dem Beladen im Test verwendet.

0,5 ml Milzzellsuspension (5×10^6 Zellen/ml M199) wurden mit einem gleiche Volumen Antiserum (anti-Lyt-1.2- und anti-Lyt-3.2-Serum 1:20, anti-Thy-1.2-Serum 1:40 in M199 verdünnt) oder Medium als Kontrolle für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nun durch Waschen mit je 2 ml Medium von überschüssigem Antiserum befreit und mit 0,3 ml Protein A-gekuppelten Schafserythrozyten (0,2 %) resuspendiert. Ein Zentrifugationsschritt bei 150 g für 10 Minuten erhöhte den Zellkontakt. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und schließlich auf 4°C abgekühlt. Alle Zellen, die 3 bzw. mehr Schafserythrozyten gebunden hatten, wurden als Rosetten gewer-

tet. Es wurden jeweils mindestens 300 Zellen mikroskopisch ausgezählt. Der Prozentsatz spezifischer Rosetten ergab sich aus:

$$\frac{\% \text{ Rosetten (AS)} - \% \text{ Rosetten (Kontrolle)}}{100 - \% \text{ Rosetten (Kontrolle)}} \times 100.$$

Der Prozentsatz rosettierter Zellen lag in den Kontrollansätzen stets unter 5 %.

2.2.3 EAC-Rosettentest (39)

Schafserythrozyten wurden wiederholt in RPMI-1640 gewaschen und auf eine 5 %ige Suspension eingestellt. Zu 2 ml dieser Suspension wurden 0,02 ml Kaninchen anti-SRBC-Antikörper (IgM, Cortis Lab., Miami, Fla., USA) gegeben. Die Erythrozyten wurden während einer Inkubation (15 Min.) im Wasserbad (37°C) mit obigem Antikörper beladen und danach 2mal gewaschen. Zu einer 5 %igen Suspension dieser Antikörperbeladenen Erythrozyten (EA) wurde nun ein gleiches Volumen von AKR-Mausserum (1:5 verdünnt) als Quelle von Komplementkomponenten (C) zupipettiert. Die sich anschließende Inkubation bei 37°C dauerte 45 Minuten. Nach 2maligem Waschen wurden die Zellen (EAC) zu einer 5 %igen Stammlösung resuspendiert. Diese konnte ohne Einbuße an Qualität nach Lagerung bei 4°C bis zu einer Woche für den Test von Komplementrezeptoren auf B-Zellen verwendet werden.

0,3 ml EAC (0,5 %), 0,3 ml Milzzellsuspension (2×10^6 /ml) und 0,03 ml EDTA (0,2 M) wurden 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad geschüttelt und dann auf 4°C abgekühlt. Als Kontrolle auf eine unspezifische Aggregation von Erythrozyten wurde ein Aliquot Medium statt der Milzzellen verwendet. Die Auswertung dieses Testes erfolgte analog dem für den Protein A-Rosettentest beschriebenen Vorgehen.

2.3 Berechnung der Lyt-Subpopulationen

Die Proportionen der drei T-Zellsubpopulationen Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123 wurden aus den Lysewerten errechnet, die das anti-Lyt-1.2- und anti-Lyt-3.2-Alloantiseraum entweder für sich allein oder in Kombination bewirkten. Tab. 5 veranschaulicht das Vorgehen im Detail. Die Lyt-Subpopulationen wurden stets prozentual als Anteile der gesamten Lyt-positiven Zellen einer Präparation ausgedrückt. Da bisher nicht gefunden wurde, daß Lyt-2- und Lyt-3-Determinanten unabhängig voneinander, z.B. auf separaten Zellen, exprimiert sein können (27), und da die ihnen zugehörigen Antiseren gegen HRS-Milzzellen gleiche Lysewerte erzielten, wurde, wie oben angegeben, das zu jener Zeit leichter zugängliche anti-Lyt-3.2-Serum verwendet.

Tabelle 5: Berechnung der Lyt-Populationen

Antiseren	Lysierte Lyt-Population			% Lyse *
anti-Lyt-1.2	Lyt-1	Lyt-123		A
anti-Lyt-3.2		Lyt-23	Lyt-123	B
anti-Lyt-1.2 + anti-Lyt-3.2	Lyt-1	Lyt-23	Lyt-123	C

* Daraus folgt: C = gesamte Lyt⁺-Population, C-B = Lyt-1-Population, C-A = Lyt-23-Population, A+B-C = Lyt-123 Population.

2.4 Antikörper-Komplement-abhängige Eliminierung von Zellen zur Anreicherung von Lymphozyten-Subpopulationen

2.4.1 Isolierung von B-Lymphozyten (95)

100×10^6 Milzzellen wurden wie unter B. 2.1.1. und B. 2.1.3 angegeben präpariert und nach Zentrifugation in 1,5 ml Volumen einer Mischung mehrerer Alloantiseren (anti-Thy-1.2, anti-Lyt-1.2, anti-Lyt-2.2 und anti-Lyt-3.2) resuspendiert. Jedes dieser Seren war 1:30 in BSS verdünnt worden. Nach einer Sensitisierungsphase von 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert und das Zellsediment in 1,5 ml Kaninchenkomplement in der Verdünnungsstufe 1:10 aufgenommen. Daran schloß sich abermals eine Inkubation von 30 Minuten, nun aber bei 37°C, an. Die Reaktion wurde durch Verdünnen mit BSS beendet, worauf die Zellen abzentrifugiert wurden. In einem zweiten Reaktionszyklus wurden die Zellen mit 0,75 ml der gleichen Antiserummischung und dem gleichen Volumen Komplement in den oben angegebenen Endverdünnungen für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In zwei Waschschritten wurden die Zellen von lysierten Zellen und von überschüssigen Reagenzien befreit. Das Endsediment wurde zur Kultivierung der B-Zellen mit isolierten Lyt-1_i-Zellen und Schafserythrozyten unter den von Mishell und Dutton ausgearbeiteten Bedingungen (113) in Kulturmedium aufgenommen. Die Reinheit der Zellpräparationen wurde durch entsprechende Kontrollen in den jeweiligen funktionellen Testen überprüft.

2.4.2 Isolierung von Lyt-1_i-Zellen (95)

Diese Zellpopulation wurde aus Milzen von Mäusen gewonnen, die 7 - 14 Tage zuvor mit 10^8 Schafserythrozyten immunisiert worden waren. 100×10^6 Milzzellen wurden analog dem obigen Verfahren zur Anreicherung von B-Zellen behandelt, wobei die Antiserenmischung in diesem Fall anti-Lyt-2.2 und anti-Lyt-3.2 in der jeweiligen Endverdünnung von 1:30 enthielt.

Nach zwei Reaktionszyklen wurden Ig-positive Zellen durch Passage der verbliebenen Zellen über eine Nylonwollsäule abgetrennt. Die eluierten Lyt-1_1 -Zellen wurden im Helfersystem (B. 3.6.2) und dem Rückkopplungs-Suppressionssystem (B. 3.6.3) untersucht. Die Effizienz der Lyt-1_1 -Anreicherung ist dem Resultateteil zu entnehmen (Tab. 25).

2.5 Immunisierung mit Schafserthrozyten in vivo

10^8 Schafserthrozyten wurden den Mäusen in einem Volumen von 0,2 ml BSS in die Schwanzvene injiziert. Nach 7 - 14 Tagen wurden wie unter B. 2.4.2 beschrieben die Lyt-1 -Zellen aus den Milzen der immunisierten Tiere isoliert (Lyt-1_1).

3. Testmethoden für T-Zellfunktionen in vitro

3.1 Mitogene Stimulierung von Milzlymphozyten mit Con A und LPS (124)

5×10^5 Milzzellen wurden in Gegenwart von 0,01 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ Con A (Calbiochem, La Jolla, Cal., USA) und 0,1 - 100 μg LPS (Difco, Detroit, Mich., USA) in einem Volumen von 0,2 ml in Mikrotiterplatten mit flachem Boden (Micro-Test II plates, Falcon Plastics, Oxnard, Ca., USA) bei 6 % CO_2 und 37°C kultiviert. Für diesen Test verwendeten wir Basismedium (siehe 1.1), das mit 1 mM Natriumpyruvat, 0,075 % Natriumbicarbonat und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (Flow Lab., Irvine, Schottland) supplementiert worden war. Nach 48 Stunden wurden 2 $\mu\text{Ci}/0,05$ ml [Methyl- ^3H]-Thymidin (New England Nuclear, spezifische Aktivität 6,7 Ci/mM) für weitere 4 Stunden Kultur hinzugefügt. Danach wurden die Kulturen auf 4°C abgekühlt und mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf Glasfaserfilter geerntet. Die Filter wurden in Zählgläser transferiert, mit 3 ml Aquasol (New England Nuclear) versetzt, und die Radioaktivität der Proben wurde in einem Packard-Flüssig-Szintillationszähler bestimmt.

Als Maß für die Proliferation der Zellen auf den mitogenen Stimulus hin dienten die gezählten Impulse (cpm). Die Proliferationswerte wurden als Differenz der cpm von Mitogen-stimulierten Kulturen und unstimulierten Kontrollkulturen berechnet (Δ cpm).

3.2 Mitogene Stimulierung von Milzlymphozyten mit PHA

Gefrieretrocknetes PHA-M (Difco Nr. 0528-56) wurde in 5 ml RPMI-1640 gelöst und in Aliquoten bei -20°C gelagert. 2×10^5 Milzzellen wurden in 0,2 ml Basismedium, supplementiert mit 5 % menschlichem Plasma, mit PHA in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:30 bis 1:240) kultiviert (6 % CO_2 , 37°C). 72 Stunden nach Ansetzen der Kulturen wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in die Zellen wie unter B. 3.1 beschrieben ermittelt.

3.3 Proliferation alloreaktiver T-Lymphozyten in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC, Ref. 92)

Die Präparation der Responder- und Stimulatorzellen aus Milzen von Mäusen erfolgte wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben. $7,5 \times 10^5$ Responderzellen wurden mit der gleichen Zahl von bestrahlten Stimulatorzellen (2000 R) oder zur Kontrolle bestrahlten Responderzellen (2000 R) in einem Volumen von 0,2 ml in Mikrotiterplatten mit flachem Boden bei 37°C und 6 % CO_2 inkubiert. Als Kulturmedium wurde Basismedium, komplettiert mit 5×10^{-5} M 2-Mercaptoaethanol und 5 % Ratten-serum, verwendet. Nach 5 Tagen wurde die DNA-Synthese der Responderzellen aufgrund des Einbaus von ^3H -Thymidin gemessen (siehe B. 3.1). Die spezifische Aufnahme von ^3H -Thymidin ergab sich aus der Differenz der Aktivität (cpm) von allogenetisch und syngenetisch (Kontrolle) stimulierten Kulturen.

3.4 Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten (nach 122)

6×10^6 Responderzellen wurden mit 3×10^6 bestrahlten Stimulatorzellen (2000 R) oder als Kontrolle mit 3×10^6 bestrahlten Responderzellen (2000 R) in einem Volumen von 1 ml in Linbro-Kulturplatten (Linbro Chemicals, New Haven, Conn., USA) 5 Tage lang bei 37°C und 6 % CO_2 inkubiert. Responder- wie Stimulatorzellen waren wie unter B. 2.1.1 beschrieben präpariert worden. Das Basismedium enthielt zusätzlich 10 % FCS und 5×10^{-5} M 2-Mercaptoaethanol. Nach beendeter Kultur wurden die Zellen isoliert, mit modifiziertem PBS (2 % FCS) gewaschen und mit supplementiertem MEM (10 % FCS und 30 mM HEPES) auf diejenige Konzentration gebracht, die dem erforderlichen Verhältnis von Effektor-: Zielzellen im Zell-vermittelten Zytotoxizitätstest entsprach.

3.5 Zell-vermittelter Zytotoxizitätstest (CML)

Dieser Test wurde nach der von K. Brunner (75) publizierten Methode mit Modifikationen (122) ausgeführt. Stets wurden verschiedene, abgestufte Mengen von Effektorzellen zu einer konstanten Zahl von 5×10^4 Zielzellen zugegeben, wobei das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen zwischen 3:1 und 12:1 variierte. Als Medium wurde MEM mit 10 % FCS und 30 mM HEPES verwendet. 5×10^4 ^{51}Cr -markierte RLO⁷1-Tumorzielzellen (in 0,05 ml) und eine entsprechende Zahl von Effektorzellen (in 0,2 ml) wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und durch kurze Zentrifugation (5 Min. bei 50 g) in erhöhten Kontakt gebracht. Danach wurden die Platten 4 Stunden bei 37°C und 6 % CO_2 inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen in den Platten sedimentiert und die Radioaktivität von 0,1 ml des Überstandes in einem Packard Auto-Gamma-Spektrometer bestimmt. Die Lebensfähigkeit der Zielzellen wurde zur Kontrolle aus der spontanen ^{51}Cr -Freisetzung nach Inkubation von 5×10^4 Zielzellen mit 0,2 ml Medium ermittelt. Sie variierte zwischen 92 und 96 %. Maximale Freisetzung von ^{51}Cr wurde

durch die Lyse der Zielzellen mit 0,2 ml 1 N HCl erreicht. Der Prozentsatz spezifischer Lyse ergab sich gemäß der Gleichung:

$$\% \text{ spez. Lyse} = \frac{\text{cpm(A)} - \text{cpm(S)}}{\text{cpm(HCl)} - \text{cpm(S)}} \times 100$$

wobei A =allogenetisch stimulierte Effektoren, S = syngenetisch stimulierte Effektoren (Kontrolle) bedeuten .

3.6 In vitro-Antwort von Milzzellen gegen Schafserythrozyten (Mishell-Dutton-System, Ref. 113)

3.6.1 Induktion einer Primärantwort gegen Schafserythrozyten in unseparierten Milzzellen

Milzzellen, die von Erythrozyten befreit worden waren, wurden in einer Konzentrationsreihe in Mishell-Dutton-Medium suspendiert (113). Als Medium diente Basismedium, das mit 1 % Natriumpyruvat, 20 mM HEPES, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 5 % FCS supplementiert worden war. Es wurde je 1 ml dieser Zellsuspensionen in die Vertiefungen einer Linbro-platte pipettiert. 3×10^6 Schafserythrozyten pro 0,1 ml Medium, die innerhalb von 2 Wochen nach der Blutung des Schafes für diesen Test verwendet wurden und 3mal mit BSS gewaschen worden waren, wurden einschließlich 0,1 ml Nährmedium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 5 Tage bei 37°C und 6 % CO₂ auf einer Rocker-Plattform mit 5 Zyklen pro Minute bewegt. Täglich wurden pro Kultur 0,1 ml Nährmedium zugesetzt. Nach 5 Tagen wurde die Zahl der Plaque-bildenden Zellen (PFC) im Plaquetest ermittelt.

3.6.2 Kokultivierung von Lyt-1_i-Zellen mit B-Lymphozyten im Helfersystem (125)

1×10^5 bzw. 5×10^5 isolierte Lyt-1-Zellen von Mäusen, die mit Schafserythrozyten immunisiert worden waren (Lyt-1_i) wurden mit 3×10^6 isolierten B-Zellen und 3×10^6 Schafserythrozyten in 1,1 ml Mishell-Dutton-Kulturmedium für 5 Tage kultiviert. Danach wurden die gebil-

deten Plaque-bildenden Zellen ausgezählt.

3.6.3 Messung der Aktivität von Lyt-1_i -Lymphozyten im Rückkopplungs-Suppressionssystem (125)

1×10^5 bzw. 5×10^5 Lyt-1_i -Zellen, 5×10^6 Milzzellen und 3×10^6 Schafserythrozyten wurden zusammen unter Mishell-Dutton-Kulturbedingungen kokultiviert. Danach wurde die Plaquebildung bestimmt.

3.6.4 Bestimmung von Antikörper-sezernierenden Zellen im Plaquetest

Die Anzahl von IgM Antikörper-sezernierenden Zellen, die sich während einer 5-tägigen Kultivierung von Milzzellen mit Schafserythrozyten entwickelt hatten, wurden im Plaquetest nach Jerne (126) in der Modifikation nach Cunningham (127) ermittelt.

Zur Gewinnung von Meerschweinchenkomplement wurde Meerschweinchenblut durch Herzpunktion entnommen. Das Serum wurde zur Gerinnung 2 Stunden bei Raumtemperatur belassen und danach durch einen Zentrifugationsschritt erhalten. Antikörper gegen Schafserythrozyten wurden durch Absorption dieses Serums mit sedimentierten Schafserythrozyten im Verhältnis 5:1 (V/V) während einer Inkubation (30 Min.) auf Eis eliminiert.

Lymphozyten, die 5 Tage in vitro mit Schafserythrozyten kultiviert worden waren, wurden mit einer 0,5 ml Eppendorf-pipette vorsichtig resuspendiert. Nach einmaligem Waschen in BSS wurden die Zellen in diesem Medium aufgenommen. In den Experimenten zur Primärantwort unseparierter Milzzellen gegen Schafserythrozyten (B. 3.6.1) wurden die Zellen einer Kultur in 0,4 ml BSS resuspendiert, während in den Versuchen zur Aktivitätsbestimmung von isolierten Lyt-1_i -Zellen (B. 3.6.2 - 3) den geernteten, sedimentierten Zellen 0,2 ml BSS zugesetzt wurden.

Je 0,05 ml Zellsuspension, 10 %ige Schafsferythrozytensuspension, absorbiertes Meerschweinchenkomplement, 1:3 verdünnt, und BSS wurden in einem Reagenzglas gemischt und in Cunningham-Kammern transferiert. Diese bestanden aus zwei Objektträgern (76 x 26 mm), die durch doppelseitiges Klebeband zusammengehalten waren. Die Kammern wurden nach dem Beladen mit Paraffin versiegelt (Paraplast Tissue Embedding Medium, Sherwood Med. Industries, St. Louis, Miss., USA). Nach 30-minütiger Inkubation der Kammern bei 37°C wurden die Lysehöfe mit Hilfe einer Lupe in direktem Licht ausgezählt. Die Plaquezahl pro Kulturansatz konnte unter Berücksichtigung des Volumens der Zellsuspension und der Kammer (ca. 0,12 ml) berechnet werden.

4. Statistische Auswertung

In den meisten Vergleichen wurden individuelle Tiere jedes Genotyps, die bezüglich des Alters und Geschlechts übereinstimmten, untersucht. Die einzelnen Experimente wurden in der Regel in drei- bis vierfachen Ansätzen durchgeführt, wobei für die einzelnen Tests folgende Standardfehler des Mittelwertes (SEM) erhalten wurden: Antikörper-Komplement-abhängige Zytotoxizität < 6 %, Zell-vermittelte Zytotoxizität < 5 %, und Stimulierung durch Mitogene und allogenetische Zellen < 10 %. Die Resultate wurden jeweils als Mittelwerte von verschiedenen Experimenten mit den entsprechenden SEM angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student-t-Testes aufgezeigt (128).

* Dr. H.T. Thaler, Biostatistics Laboratory, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, sei vielmals für seine Ratschläge gedankt.

C. ERGEBNISSE

1. Etablierung des Testsystems an B6-Mäusen

1.1 Kriterien für die Wahl eines geeigneten Testsystems

Umfangreiche serologische Untersuchungen haben in den letzten Jahren aufgezeigt, daß Antiseren, welche Differenzierungsantigene von Lymphozyten identifizieren können, nützliche Werkzeuge sind, um funktionell unterschiedliche T-Lymphozytensubpopulationen voneinander zu unterscheiden und sogar zu trennen. Durch Behandlung mit spezifischem Alloantiserum und Komplement im zytotoxischen Test werden diejenigen Zellen einer heterogenen Zellpopulation getötet und damit selektiv eliminiert, die das entsprechende Antigen auf ihrer Oberfläche tragen.

Wir haben diese Technik zur Charakterisierung der Lyt-Subsets in HRS-Mäusen erfolgreich angewandt. Dem zytotoxischen Test haben wir gegenüber anderen Alternativmethoden, wie dem ^{125}I -Protein A-Bindungstest (129) sowie der Absorption der Seren mit HRS-Zellen und Testen der verbliebenen Antikörper auf empfindlichen Zielzellen, den Vorzug gegeben, da im Falle eines positiven Ergebnisses die dann erarbeiteten Bedingungen für die selektive Eliminierung von bestimmten T-Zellsubpopulationen beibehalten werden konnten. Der Prozentsatz lysierter Zellen wurde im ^{51}Cr -Freisetzungstest bestimmt (130). Die Messung der nach Zellyse in den Überstand abgegebenen ^{51}Cr -Radioaktivität besitzt gegenüber der mikroskopischen Auszählung der Zellen nach Anfärbung mit einem Vitalfarbstoff aufgrund der größeren Präzision und Objektivität des Verfahrens deutliche Vorzüge. Die größere Präzision wird u.a. dadurch bedingt, daß alle in einer Testprobe befindlichen Zellen berücksichtigt werden ($2,5 \times 10^5$ gegenüber $1 - 4 \times 10^2$ Zellen).

1.2 Standardisierung des Testsystems

Fassen wir die gesamte T-Zellpopulation der Milz zu einem T-Zellkompartiment zusammen, dann läßt sich dieses aufgrund der Expression der Lyt-Oberflächenmarker Lyt-1, Lyt-2 und Lyt-3 in mindestens drei Subpopulationen bzw. Subsets unterteilen. Die Charakterisierung von Lyt-Subsets war erstmals in C57BL/6 (B6)-Mäusen beschrieben worden (57). Wir haben zunächst die Subsetverteilung an Milzzellen von B6-Mäusen bestimmt und mit den bekannten Daten verglichen. In einem ersten Schritt wurden zunächst die optimalen Bedingungen für das Testsystem und die Reaktanten ermittelt.

1.2.1 Zweistufentest

In der am häufigsten benutzten Variante des zytotoxischen Tests werden Zellen mit Antiserum und Komplement 45 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Danach wird die Zahl der toten Zellen bestimmt (Einstufentest, Ref. 116). Manche Antiseren ergeben jedoch höhere Lysewerte, wenn die Zellen nach einer Phase der Präsensibilisierung mit dem Antiserum durch einen Waschschrift von überschüssigem Serum befreit und erst anschließend mit Komplement lysiert werden (Zweistufentest, Ref. 131). Die oft beobachtete "antikomplementäre" Eigenschaft des Antiserums mag ihre Ursache in einer Kompetition von Komplementkomponenten der Maus und des Kaninchens haben. Denkbar wäre aber auch die störende Anwesenheit von Komplement-inaktivierenden Substanzen (132) wie z.B. Spuren von nicht-inaktivierten Proteasen im Antiserum. Der zweite Punkt trifft wohl besonders auf absorbierte Antiseren zu, da durch spontane Zellyse während des Absorptionsprozesses Proteasen und andere Komplement-inaktivierende Substanzen in das Serum gelangen können.

Für vergleichende Untersuchungen im Ein- und Zweistufentest haben wir B6-Milzzellsuspensionen in zwei Aliquote geteilt. Im Einstufentest wurden die Zellen in mehrfachen Ansätzen mit anti-Thy-1.2-, anti-Lyt-1.2- oder anti-Lyt-3.2-Antiserum und

mit Kaninchenkomplement 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Für den Zweistufentest wurden verschiedene Zellansätze mit den genannten Antiseren 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, 1mal mit Medium gewaschen und anschließend mit Komplement 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Prozentsatz toter Zellen wurde in beiden Fällen nach Zugabe von Trypanblau ermittelt.

Tabelle 6 demonstriert die Überlegenheit des Zweistufentests. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch die zusätzlichen Manipulationen nicht beeinträchtigt, wie die vergleichbaren Resultate der Antiserum- und Komplementkontrolle aufzeigen. Die höhere Effizienz des Zweistufentests zeigt sich vor allem bei der Verwendung der beiden Lyt-Antiseren. Im Fall von anti-Thy-1.2-Serum ist sie nicht so stark ausgeprägt.

Um den Einfluß der Temperatur auf die Präsensitisierungsphase der Zellen zu ermitteln, wurde im nächsten Schritt deren Temperaturabhängigkeit im Zweistufentest untersucht. Aus Tab. 7 ist ersichtlich, daß einer Präsensitisierung der Zellen mit Antiserum bei tiefen Temperaturen der Vorzug zu geben ist. Die Behandlung mit Antiserum bei 0°C oder Raumtemperatur ergab höhere Lysewerte als die Behandlung bei 37°C, wobei sich das anti-Lyt-3.2-Serum als besonders empfindlich gegen Systemvariationen erwies.

1.2.2 Komplement

Ein entscheidender Reaktionspartner im zytotoxischen Test ist das Komplement. Wir haben in unseren Experimenten Normalserum von Kaninchen als Komplementquelle verwendet. Kaninchenserum hat sich in der Lyse von kernhaltigen Zellen den bisher getesteten Seren anderen Ursprungs (z.B. Mensch, Meerschweinchen) als überlegen erwiesen (133 - 135). Seren von drei ausgewählten Kaninchen standen zum Zeitpunkt der im folgenden beschriebenen Vorversuche zur Verfügung. Diese wurden zunächst auf Milzzellen von B6-Mäusen im Hinblick auf ihre Aktivität getestet. Tab. 8 veranschaulicht das experimentelle Vorgehen am Beispiel derjenigen Komplementquelle, die sich als am aktivsten erwiesen hatte. Milz-

Tabelle 6: Vergleich der Lyseeffizienz verschiedener Alloantiseren im Einstufen- und Zweistufen-
test der Komplement-abhängigen Lyse von B6-Milzzellen

Test- system	% tote Milzzellen ^{a)}		% spezifische Lyse ^{b)}			
	Antiserum- kontrolle ^{c)}	Komplement- kontrolle ^{d)}	Antiserum gegen			
			Thy-1.2	Lyt-1.2	Lyt-1.2	Lyt-3.2
Einstufen- test ^{e)}	17	19	42	29	28	12 1
Zweistufen- test ^{f)}	16	18	46	38	34	24 7

- a) bestimmt durch mikroskopische Auszählung nach Trypanblaufärbung, angegeben als % der Gesamtzellzahl
- b) % spezifische Lyse = $\frac{\% \text{ tote Zellen (AS)} - \% \text{ tote Zellen (KK)}}{100 - \% \text{ tote Zellen (KK)}} \times 100$
- c) Zugabe von Medium statt Komplement
- d) Zugabe von Medium statt Antiserum
- e) Inkubation der Zellen mit Antiserum und Komplement 45 Minuten, 37°C
- f) Inkubation der Zellen mit Antiserum 30 Minuten bei Raumtemperatur, nach Waschen der Zellen Komplementzugabe für 30 Minuten bei 37°C

Tabelle 7: Temperaturabhängigkeit der Präsensitisierungsphase im Zweistufentest der Komplement-abhängigen Lyse von B6-Milzzellen

Präsensitisierungs- phase *) bei	% spezifische Lyse	
	Thy-1.2	Lyt-3.2
0°C	34	8
RT	31	9
37°C	24	1

*) Inkubation der B6-Milzzellen mit Antiserum für 30 Minuten

Tabelle 8: Komplementtitration auf Milzzellen von B6-Mäusen

Komplement- verdünnung	% tote Zellen		% spezifische Lyse Lyt-3.2
	Antiserum- kontrolle ^{a)}	Komplement- kontrolle ^{b)}	
— a)	25		
1:33		26	12
1:30		31	9
1:27		38	3

a) Zugabe von Medium anstelle von Komplement

b) Zugabe von Medium statt Antiserum

zellen von B6-Mäusen, die nicht mit Antiserum beladen worden waren, wurden mit verschiedenen Verdünnungen von Komplement (Komplementkontrolle) behandelt, und der Prozentsatz toter Zellen wurde bestimmt. Der Vergleich mit der Serumkontrolle (Zellen + Alloantiserum, jedoch ohne Komplement) zeigte an, daß mit ansteigender Konzentration des Komplements dessen Toxizität für die Zellen zunahm. Die parallel durchgeführte Messung der Lyseeffizienz des Komplements für Zellen, die mit spezifischem Antiserum beladen worden waren, machte deutlich, daß mit zunehmender Toxizität die spezifische lytische Aktivität abnahm. In den folgenden Experimenten mit B6-Milzzellen wurde daher dieses Komplement in der nicht-toxischen Verdünnung 1:33 verwendet.

1.2.3 Antiseren

Bei den von uns verwendeten Antiseren handelt es sich durchwegs um Alloantiseren. Sie bilden einen weiteren wesentlichen Faktor im zytotoxischen Test, wobei hohe Anforderungen in Bezug auf deren Spezifität und Aktivität gestellt werden.

1.2.3.1 Gewährleistung der Spezifität der Alloantiseren

Alloantiseren enthalten oft neben spezifischen Antikörpern zusätzlich Antikörper unbekannter Spezifität (136,137), sowie Autoantikörper (138), die mit eigenen Zellen des Antikörperproduzenten, und zwar in besonders hohem Maße mit Thymozyten, reagieren. Verunreinigende Antikörper wurden stets mit Zellen herausabsorbiert, auf deren Oberfläche das im Einzelfall interessierende Antigen phänotypisch nicht exprimiert war.

Tab. 4 faßt die wesentlichen Punkte des Absorptionsprozesses für die verwendeten Antiseren zusammen. Jeder Absorptionsansatz wurde auf Thymozyten und Milzzellen kongener Mäusestämme getestet, um sicherzustellen, daß die Absorption vollständig und ohne wesentliche Minderung der Aktivität verlaufen war. Die Verwendung von Zellen kongener Mäuse

ist wichtig, da nur unter diesen Bedingungen die ermittelte lytische Aktivität eines Antiserums eindeutig dem zugehörigen Antigen zugeschrieben werden kann.

Abb. 4 illustriert exemplarisch das Vorgehen im einzelnen für eine Spezifitätstestung eines absorbierten Lyt-1.2-Antiserums. Gegen die Zielzelle B6-Lyt-1.1-Thymozyt war zweifach absorbiertes anti-Lyt-1.2-Antiserum, wie zu erwarten, nicht reaktiv, während hingegen nicht-absorbiertes Lyt-1.2-Serum in gewissem Grade eine unspezifische Lyse zur Folge hatte (Titer 1:80). Gelegentlich führte die Absorption zu einem geringen Aktivitätsverlust in der spezifischen Reaktion gegenüber der positiven Zielzelle (in diesem Fall B6-Thymozyt), der, wie bereits erörtert, möglicherweise auf die Freisetzung Komplement-inaktivierender Substanzen durch tote Zellen zurückzuführen sein mag. Außerdem ist dieser Effekt von einem geringen Verdünnungseffekt, bedingt durch den Absorptionsvorgang, überlagert. Im Gegensatz zu Thymozyten wurden Milzzellen von Lyt-1.2-positiven B6-Mäusen von dem absorbierten wie dem Ausgangsserum mit gleicher Effizienz lysiert.

1.2.3.2 Titration der Antiseren auf B6-Milzzellen

Zur Bestimmung der Lyt-Subsets wurden die spezifischen Antiseren in einer Verdünnung verwendet, die maximale Lyse der Zellen bewirkte. Um die geeignete Serumverdünnung im Einzelfall festzustellen, wurden Titrationskurven aufgestellt. Dabei wurden die Antiseren in steigender Verdünnung von 1:10 bis 1:320 eingesetzt, und die zugehörige Lyseeffizienz wurde experimentell ermittelt.

Abb. 5 zeigt die mit anti-Thy-1.2, anti-Lyt-1.2 und anti-Lyt-3.2 erhaltenen Titrationskurven. Gemäß diesen Titrationskurven haben wir in den folgenden Versuchen beide Lyt-Antiseren in der Verdünnung 1:20 und Thy-1.2-Antiserum mit 1:40 eingesetzt.

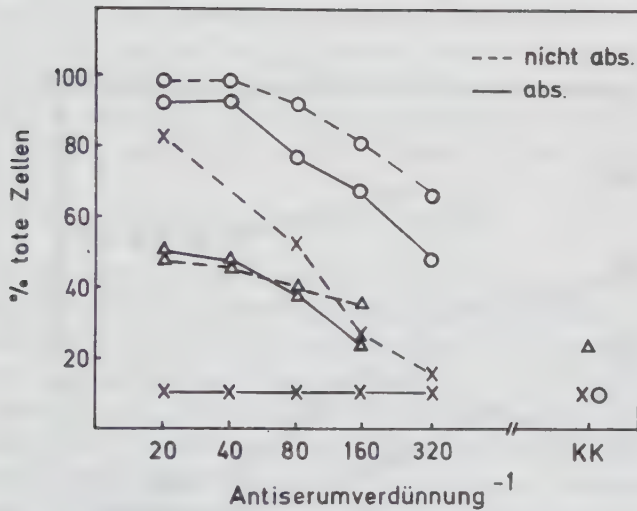


Abb. 4: Spezifitätstest des absorbierten Antiserums
anti-Lyt-1.2

2fach absorbiertes und nicht-absorbiertes anti-Lyt-1.2-Antiserum wurde auf Thymus- und Milzzellen der kongenen Mäuse B6 und B6-Lyt-1.1 getestet. Die Auswertung erfolgte im Einstufentest mit mikroskopischer Auszählung toter Zellen. Zur Durchführung der Absorption siehe Methodenteil.

- B6-Thymozyten
- ×—× B6-Lyt-1.1-Thymozyten
- △—△ B6-Milzzellen

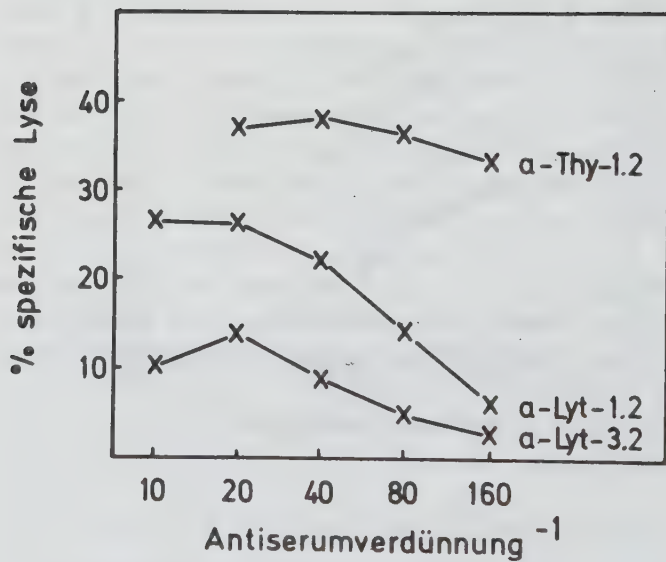


Abb. 5: Titration von anti-Thy-1.2-, anti-Lyt-1.2- und anti-Lyt-3.2-Antiserum

Die 2fach absorbierten Antiseren wurden auf Milzzellen von B6-Mäusen im ^{51}Cr -Zweistufentest titriert.

1.3 Bestimmung der Lyt-Subsets in B6-Milzzellen

Die in den Vorversuchen gefundenen optimalen Testbedingungen wurden nun bei der Bestimmung der T-Zellsubpopulationen beibehalten. Zur Charakterisierung der Lyt-Subsets wurden anti-Lyt-1.2- und anti-Lyt-3.2-Serum entweder allein oder in Kombination verwendet. Aus den erhaltenen Lysewerten konnten die Proportionen der drei bekannten Subsets Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123 rechnerisch ermittelt werden (siehe Methoden).

1.3.1 Lyt-Subsets in jungen B6-Mäusen

Tab. 9 gibt die Repräsentation der T-Zellsubpopulationen in Milzzellen von $2\frac{1}{4}$ Monate alten B6-Mäusen wieder. (9A). Darüberhinaus sind die Lysewerte aufgeführt, die der Berechnung der Subpopulationen zugrunde lagen (9B). Anteilig an der gesamten Lyt-positiven (Lyt⁺) Population, deren Zellen eines oder beide Lyt-Antigene auf ihrer Oberfläche exprimierten, waren Lyt-123-Zellen mit 63 % am stärksten vertreten, es folgten Lyt-1-Zellen mit 34 %, während Lyt-23-Zellen mit 3 % den mengenmäßig kleinsten Set bildeten. 88 % der Thy-1⁺-Zellen waren Lyt⁺. Dieses Ergebnis läßt sich dahingehend interpretieren, daß in B6-Milzzellen möglicherweise eine Subpopulation von Thy-1⁺-Zellen vorkommt, die Lyt-negativ ist. Andererseits könnte es auch Unterschiede in der Effizienz des anti-Thy-1.2-Serums im Vergleich zu den anti-Lyt-Antisera widerspiegeln, die ihrerseits ihre Ursache in quantitativen Unterschieden der Antigenpräsenz auf der Oberfläche der T-Zellen haben könnten. Diese Resultate stimmten mit den in der Literatur publizierten Daten überein (57).

In allen folgenden Untersuchungen sind die Lyt-Subsets stets als Prozentsatz der gesamten Lyt-positiven Zellpopulation angegeben.

1.3.2 Reproduzierbarkeit der Subsetbestimmung

Eine B6-Milzzellsuspension einer drei Monate alten Milz wurde in zwei gleiche Aliquote A und B unterteilt (siehe Tab. 10).

Tabelle 9: Berechnung der Proportionen der drei bekannten
Lyt-Subpopulationen Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123
in der Milz einer $2\frac{1}{4}$ Monate alten B6-Maus

A

Lyt- Population	Prozentualer Anteil (%) ^{a)}		innerhalb der
	Milzzell- Population	Thy-1 ⁺ - Population	Lyt ⁺ - Population ^{b)}
Lyt ⁺ b)	38	88	100 (Stan- dard)
Lyt-1	13	30	34
Lyt-23	1	2	3
Lyt-123	24	56	63

B

% Lyse von Milzzellen		% spezifische Lyse			
Serum- kontrolle	Komplement- kontrolle	Thy-1.2	Lyt-1.2	Lyt-3.2	Lyt-1.2 +Lyt-3.2
18	22	43	37	25	38

a) Bestimmt im ^{51}Cr -Freisetzungstest

b) $\text{Lyt}^+ = \text{Lyt-1} + \text{Lyt-23} + \text{Lyt-123}$

Obwohl in beiden Aliquoten der mengenmäßige Anteil der Lyt-positiven Zellen an der gesamten Milzzellsuspension leicht differierte, zeigten beide Aliquote die gleiche Lyt-Set-repräsentation, d.h. die Proportionen der einzelnen T-Zell-subsets zueinander stimmten weitgehend überein.

Tabelle 10: Parallele Bestimmung der Repräsentation von Lyt-Set in zwei identischen Aliquoten der Milzzellsuspension einer 3 Monate alten B6-Maus

Aliquot	Lyt-Setrepräsentation als %						
	der Milzzellpopulation				der Lyt ⁺ -Population*		
	Lyt ⁺	Lyt-1	Lyt-23	Lyt-123	Lyt-1	Lyt-23	Lyt-123
A	29	17	0	12	58	0	42
B	23	13	0	10	58	0	42

* $\text{Lyt}^+ = \text{Lyt-1} + \text{Lyt-23} + \text{Lyt-123}$

1.3.3 Ontogenie der Lyt-Setverteilung

In der Literatur war in Milzzellsuspensionen von B6 (57)-und BALB/c (125)-Mäusen eine mengenmäßige Zunahme der Lyt-1- und eine Abnahme der Lyt-123-Population mit zunehmendem Alter der Tiere beschrieben worden. Unsere vergleichende Analyse der Lyt-Setentwicklung in B6-Milzen konnte diesen Trend voll bestätigen (siehe Tab. 11).

Tabelle 11: Ontogenetische Entwicklung der Lyt-Subsets in der Milz von B6-Mäusen

Alter der Mäuse in Monaten (Gruppe)	% spezifische Lyse		Lyt-Setrepräsentation (% Lyt ⁺)		
	Thy-1 ⁺ - Zellen	Lyt ⁺ - Zellen	Lyt-1	Lyt-23	Lyt-123
2 (I)	43±4 ^{*)}	40±2	40±4	6±4	54±5
3 (II)	39±3	35±3	52±3	6±4	42±5
13 (III)	45	32	84	0	16

*) Mittelwerte ± SEM von 3 Mäusen in Gruppe I, 4 Mäusen in Gruppe II und 1 Maus in Gruppe III.

2. Serologische Untersuchungen an Lymphozyten von hr/hr-Mäusen

Ausgehend von der Fragestellung, ob durch die hr-Mutation das normale Gleichgewicht zwischen den einzelnen T-Zellsubpopulationen Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123 möglicherweise gestört ist, unternahmen wir eine umfangreiche serologische Analyse der Lymphozyten in Milz, Lymphknoten und Thymus von Tieren verschiedener Altersgruppen. In den folgenden Experimenten wurden die Zellen homozygoter, mutanter Mäuse (hr/hr) denen von heterozygoten, behaarten Geschwistern (+/hr) gleichen Geschlechts gegenübergestellt. Es wurden nur Tiere verwendet, die weder eine Vergrößerung der Milz noch der Lymphknoten aufzeigten, und die, im Falle der Heterozygoten, keine Andeutung von Haarverlust aufwiesen.

2.1. Serologische Charakterisierung der Milzzellen von hr/hr-Mäusen

Milzzellen von Mäusen der Altersstufen 1 - $1\frac{1}{2}$ Monate (Gruppe I) 2 - $2\frac{1}{2}$ Monate (Gruppe II), 3 - $3\frac{1}{2}$ Monate (Gruppe III) und 7 - 10 Monate (Gruppe IV) wurden vergleichend analysiert. Für die Untersuchungen mußte neu hergestelltes Komplement verwendet werden. Gemäß den durchgeführten Komplementtitrationen auf HRS-Zellen wurde das Komplement in der Verdünnung 1:24 eingesetzt.

2.1.1 T- und B-Zellsets

Zunächst wurde der prozentuale Anteil der T-Lymphozyten an der gesamten Zellpopulation in Milzen von hr/hr- und +/hr-Mäusen mit anti-Thy-1.2-Antiserum im zytotoxischen Test bestimmt. Es wurde gefunden, daß der Prozentsatz von Thy-1-positiven Zellen in beiden Genotypen ähnlich war und mit dem Alter in geringem Maße zunahm (Tab. 12).

Ebenso war die Gesamtzahl der Zellen, die für eines oder beide Lyt-Antigene (Lyt-1 und Lyt-3) eine positive Reaktion zeigten, in beiden Genotypen ähnlich und stieg ebenfalls mit

Tabelle 12: Bestimmung der Proportionen von T- und B-Zellen in HRS-Milzen

Lymphozyten- kompartiment	Oberflächen- marker	Alter der Mäuse (Monate)							
		1 - 1.5 (Gruppe I)		2 - 2.5 (Gruppe II)		3 - 3.5 (Gruppe III)			
		hr/hr	+ / hr	hr/hr	+ / hr	hr/hr	+ / hr		
		% Marker-positive Zellen in der Milz $\pm$ SEM ^{*)}							
T	Thy-1	17 $\pm$ 1	21 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3	26 $\pm$ 2	25 $\pm$ 1	24 $\pm$ 3	25 $\pm$ 1	25 $\pm$ 1
	Lyt	18 $\pm$ 1	19 $\pm$ 2	25 $\pm$ 1	26 $\pm$ 1	24 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	24 $\pm$ 1	24 $\pm$ 1
B	Ig	39 $\pm$ 1	46 $\pm$ 1	48 $\pm$ 1	53 $\pm$ 1	54 $\pm$ 1	56 $\pm$ 1	58 $\pm$ 1	57 $\pm$ 1
	CR	26 $\pm$ 1	35 $\pm$ 2	44 $\pm$ 1	44 $\pm$ 1	56 $\pm$ 1	53 $\pm$ 1	57 $\pm$ 1	56 $\pm$ 2
		7 - 10 (Gruppe IV)		hr/hr		hr/hr		hr/hr	

*) Die Daten für Thy-1 und Lyt beziehen sich auf Tests mit denselben Mäusen: Getestet wurden 7 Paare in Gruppe I, 4 Paare in Gruppe II, 8 Paare in Gruppe III und 8 Paare in Gruppe IV. Die Bestimmung von Ig⁺- und CR⁺-Zellen wurde an anderen Paaren durchgeführt: 2 Paare pro Altersgruppe für Ig⁺-Zellen und 5 weitere Paare (im ganzen 7) für CR⁺-Zellen.

zunehmendem Alter leicht an. Diese Zahl erhielten wir aus den Lysewerten, die resultierten, wenn anti-Lyt-1- und anti-Lyt-3-Antiserum kombiniert den Zellen zugegeben wurden. Es fiel auf, daß in manchen Fällen die Zahl der Lyt-positiven Zellen die der Thy-1-positiven Zellen sogar übertraf, was möglicherweise seine Ursache darin hat, daß einzelne Lyt-positive Zellen zwar Thy-1-positiv sind, jedoch das Thy-1-Antigen nur in geringer Dichte tragen und daher mit dem anti-Thy-1.2-Antiserum nicht so effizient registriert werden. Eine naheliegende Alternativerklärung, nämlich eine Verunreinigung von Lyt-Antiserum trotz intensiver Absorption kann aufgrund separater Kontrollexperimente (siehe C. 2.1.2.5) als wenig wahrscheinlich angesehen werden. Schließlich kann die mögliche Existenz von Thy-1-negativen Lyt-positiven Zellen prinzipiell nicht ausgeschlossen werden.

Zur Charakterisierung des B-Zellkompartimentes haben wir Ig-positive (139,140) und CR-positive (141,142) Zellen ermittelt. Wir verwendeten dazu den Protein A- bzw. den EAC-Rosetten-test (Einzelheiten der Teste siehe Methodenteil). Es wurde gefunden, daß zwischen vergleichbaren Zellen beider Genotypen kein Unterschied in den relativen Anteilen beider Zellpopulationen festzustellen war. Beide Populationen zeigten in ihrer prozentualen Repräsentation einen Anstieg mit dem Alter, eine Beobachtung, die auch bereits für andere Mäusestämme berichtet worden war (143,144). Das geringere Vorhandensein von CR-positiven Zellen in jungem Alter der Mäuse harmonisiert mit der Tatsache, daß B-Zellen in ihrer Entwicklung zuerst Immunglobuline und später Komplementrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren (M.P. Scheid, pers. Mitteilung).

2.1.2 Repräsentation der Lyt-Sets

2.1.2.1 Untersuchungen an unseparierten Milzzellen im zytotoxischen Test

Die soeben geschilderten Experimentalergebnisse zeigten an, daß keine serologisch feststellbaren Disproportionen im

Gesamt- T- und B-Zellkompartiment der Milzen von hr/hr-Mäusen vorlagen. Es war nun von Interesse, zu prüfen, ob in homozygoten hr/hr-Tieren eventuell innerhalb des T-Zellkompartimentes Störungen festzustellen wären, und, falls Störungen manifest würden, ob eine Altersabhängigkeit bestünde, wie man vermuten könnte. Bei der Unterteilung der T-Zellklasse in die Lyt-Subpopulationen Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123 wurde entsprechend den oben dargestellten Methoden verfahren.

Die Proportionen der drei Lyt-Subsets in den Milzen von 1 - 10 Monate alten Mäusen beider Genotypen sind in Abb. 6 wiedergegeben. Sowohl in hr/hr- als auch in +/-hr-Milzen nahm der Prozentsatz von Lyt-1-Zellen bis zum Alter von ungefähr $2\frac{1}{2}$ Monaten zu und der Prozentsatz von Lyt-123-Zellen ab (Gruppe I und II). Mäuse, die älter als 3 Monate waren, zeigten jedoch einen großen Unterschied in der Repräsentation der Lyt-Zellen in beiden Genotypen. In heterozygoten +/-hr-Tieren setzte sich der altersabhängige Zuwachs an Lyt-1-Zellen und die Abnahme an Lyt-123-Zellen über $2\frac{1}{2}$ Monate hinaus weiterhin fort, analog dem beschriebenen Verhalten der Subsets in BALB/c- (125) und B6-Mäusen (57, und Paragraph C. 1.3.3). Im Gegensatz dazu war in vergleichbaren homozygoten Mäusen die Lyt-1-Population vermindert und die Lyt-123-Population erhöht. Der Unterschied zwischen hr/hr- und +/-hr-Zellen stellte sich als statistisch signifikant heraus ($P < 0,001$ für die Lyt-1-Population und $P < 0,02$ für die Lyt-123-Population). Darüberhinaus zeigten heterozygote (+/hr) Mäuse der Altersgruppe IV (7 - 10 Monate) eine ähnliche Subsetverteilung wie homozygote (hr/hr) Tiere der Gruppe III. Die Lyt-1-Zellen haben mengenmäßig abgenommen, während die Lyt-123 Zellen simultan mengenmäßig zugenommen haben.

Bei einem Vergleich des anteiligen Verhältnisses von Lyt-1- und Lyt-123-Zellen innerhalb der T-Zellpopulation von $3 - 3\frac{1}{2}$ Monate alten Mäusen beider Genotypen wird außerdem deutlich, daß in hr/hr-Milzen etwa doppelt so viele Lyt-123-

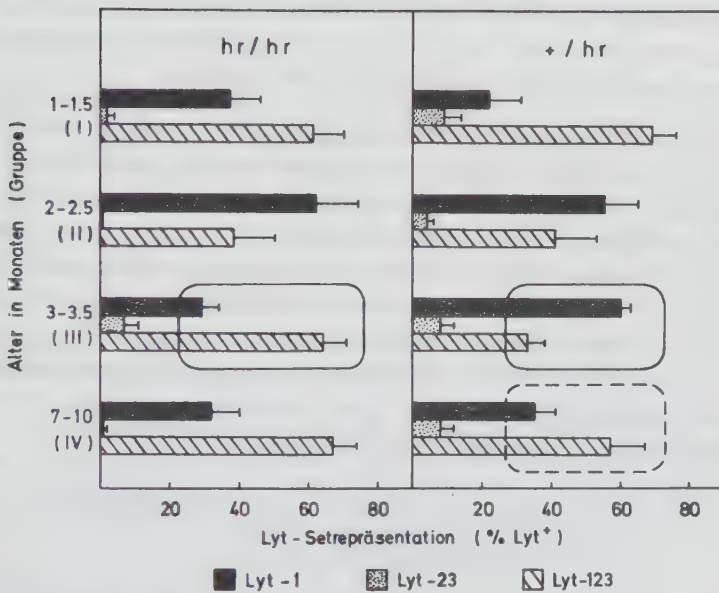


Abb. 6: Lyt-Setverteilung in Milzen von hr/hr- und +/-hr-Mäusen von 4 verschiedenen Altersgruppen

Siehe Legende zu Tab. 12 für die Zahl der getesteten Mäuse.

Zellen vorhanden waren wie Lyt-1-Zellen, während hingegen in +/hr-Milzen Lyt-1-Zellen stark überwiegen (Faktor ca. 2).

Homozygote HRS-Mäuse zeigen also in ihrer Entwicklung eine Disproportion der Lyt-1- und Lyt-123-Subsets zu einem früheren Zeitpunkt als heterozygote Mäuse.

In diesen Vergleich der Subsetrepräsentation ist die Lyt-23-Population bewußt nicht einbezogen worden. Ähnlich wie in anderen Mäusestämmen war der Anteil der Lyt-23-Population in HRS-Milzen zu gering, als daß er mit den gegenwärtigen serologischen Methoden verläßlich hätte bestimmt werden können. So ist es momentan noch ungewiß, ob der gegenüber heterozygoten Mäusen geringere Gehalt an Lyt-23-Zellen in hr/hr-Mäusen der Altersgruppen I, II und IV einen realen Trend widerspiegelt, oder ob es sich dabei um methodische Schwankungen innerhalb der Fehlerbreite handelt.

2.1.2.2 Untersuchungen an unseparierten Milzzellen im Protein A-Rosettentest

Im Verlauf der Untersuchungen haben wir den Protein A-Rosettentest (145) für unsere Fragestellung adaptiert, da er eine willkommene Ergänzung zur Komplement-vermittelten Zellyse darstellt. Der Test beruht auf der Bindung von Protein A aus Staph.aureus-Bakterien an den F_C -Teil von Antikörpern vornehmlich der IgG-Klasse (146), in geringerem Maße auch von Antikörpern der IgM-Klasse (147). Mit Protein A gekuppelte Schafserythrozyten werden als Indikatorzellen zu Lymphozyten gegeben, die man zuvor mit einem spezifischen Antiserum inkubiert hat. Diejenigen Zellen, die den spezifischen Antikörper aufgrund der Expression entsprechender Antigene binden können, sind an ihrer Rosettenbildung mit den Erythrozyten leicht zu erkennen und können mikroskopisch ausgezählt werden.

Da Protein A bevorzugt an Immunglobulin der IgG-Klasse bindet, Komplement jedoch durch IgM-Antikörper wesentlich

leichter aktiviert wird, könnte man erwarten, daß bestimmte Antiseren entsprechend ihrem IgG:IgM-Verhältnis unterschiedliche Werte mit beiden Testsystemen liefern, was tatsächlich in manchen Systemen auch gefunden wurde (M.P. Scheid, pers. Mitteilung).

Unseparierte Milzzellen von $3\frac{1}{2}$ Monate alten HRS-Mäusen wurden in diesem zweiten, vom zytotoxischen Test unabhängigen Testsystem auf ihre T-Subsetverteilung hin untersucht. Die Milzzellen wurden mit anti-Lyt-1.2- und anti-Lyt-3.2-Antiserum, entweder einzeln oder in Kombination, beladen und anschließend mit Protein A-beladenen Schafserythrozyten inkubiert. Die gebildeten Rosetten wurden mikroskopisch ausgezählt. Aus den Prozentsätzen der Rosetten-bildenden Zellen konnten die Lyt-Subpopulationen berechnet werden.

Wie aus Tab. 13 ersichtlich wird, haben Milzzellen beider Genotypen auch im Protein A-Rosettentest eine unterschiedliche Subsetverteilung. Auch in diesem Testsystem weisen die homozygoten hr/hr-Tiere eine reduzierte Lyt-1- und eine erhöhte Lyt-123-Population im Vergleich zu den heterozygoten (+/hr) Tieren auf.

Tabelle 13: Charakterisierung der Lyt-Sets in HRS-Milzen mit Hilfe des Protein A-Rosettentestes

Genotyp der Milzzellen*	% spezifische Rosetten		Lyt-Setrepräsentation (% Lyt ⁺)		
	Thy-1 ⁺ - Zellen	Lyt ⁺ - Zellen	Lyt-1	Lyt-23	Lyt-123
hr/hr	32	31	36	7	57
+ /hr	31	33	52	15	33

* Alter der Mäuse: $3\frac{1}{2}$ Monate

2.1.2.3 Charakterisierung der gereinigten T-Zellpopulation

In den soeben beschriebenen Experimenten wurden zunächst unseparierte Milzzellen auf die Gegenwart von Lyt-Markern hin untersucht. Im folgenden Experimentalansatz wurden die T-Zellen der Milz mit Hilfe einer Nylonwollsäule (123) angereichert. Diese T-Zellpopulation wurde im Zweistufentest mit mikroskopischer Auszählung der toten Zellen auf ihre Subsetzusammensetzung geprüft.

Tab. 14 zeigt in vergleichender Darstellung die Subsetpopulationen von Milz-T-Zellen von $3\frac{1}{2}$ Monate alten Tieren. Die Effizienz der B-Zellabtrennung geht aus dem Prozentsatz Ig-positiver Zellen hervor. Nur noch 9 bzw. 10 % Ig-positive Zellen waren in der Zellsuspension vorhanden. Demgegenüber waren Thy-1-positive Zellen auf 76 bzw. 85 % angereichert. Die Resultate stimmten in Bezug auf die Lyt-Subsetverteilung mit den an ganzen, nicht-separierten Milzzellsuspensionen erhaltenen Werten gut überein. Homozygote hr/hr-Milzen beinhalten einen geringeren Prozentsatz an Lyt-1 und einen höheren Prozentsatz an Lyt-123 als +/hr-Milzen.

Immerhin trat die Subsetverteilung in hr/hr-Tieren nicht so deutlich zutage wie erwartet werden konnte. Dieser Umstand ist möglicherweise auf die verwendete Anreicherungs-methode der T-Zellen zurückzuführen. Außer den bekanntlich an Nylonwolle anhaftenden B-Zellen scheinen auch manche T-Zellen mit Nylonwolle in Wechselwirkung zu treten und retardiert zu werden. Diese Wechselwirkung wurde von T. Tada für Lyt-1-Zellen (148) und von E. Eardley für Lyt-123-Zellen beschrieben (98). Ein vergleichsweise erhöhtes Anhaften von Lyt-123-Zellen während der Nylonwollpassage von hr/hr-Milzzellen sowie von Lyt-1-Zellen im Falle von +/hr-Milzen könnte zu einer teilweisen Angleichung der Subsetproportionen in den T-Zellfraktionen beider Genotypen führen.

Tabelle 14: Charakterisierung der Lyt-Sets in der angereicherten T-Zellpopulation der Milz von 3.5 Monate alten HRS-Mäusen

Genotyp der T-Zellen*	% Marker ⁺ -Zellen			Lyt-Setrepräsentation (% Lyt ⁺)		
	Thy-1 ⁺ -Zellen	Lyt ⁺ -Zellen	Ig ⁺ -Zellen	Lyt-1	Lyt-23	Lyt-123
hr/hr	76	78	9	46	8	46
+ /hr	85	81	0	60	6	33

* angereichert an Nylonwollsäulen

2.1.2.4 Vergleich von mehreren Heterozygoten

Da gewisse Variationen in den Subsetproportionen in einzelnen Experimenten erhalten wurden, wurde in Paralleltesten an drei heterozygoten Milzen die Variation in der Setverteilung pro Einzelexperiment geprüft. Alle drei Mäuse stammten aus einem einzigen Käfig; zwei von ihnen waren Geschwister.

Es zeigte sich, daß die Milzen dieser drei Mäuse eine weitgehend übereinstimmende Subsetverteilung erkennen ließen (Tab. 15). Somit ergaben sich nur geringe Schwankungen, wenn Mäuse aus einem Käfig in Paralleltesten untersucht wurden.

Tabelle 15: Bestimmung der experimentellen Variation der Subsetproportionen anhand eines Testes mit Milzen von drei heterozygoten +/-Mäusen

Maus Nr.*)	% spezifische Lyse		Lyt-Setrepräsentation (% Lyt ⁺)		
	Thy-1 ⁺ - Zellen	Lyt ⁺ - Zellen	Lyt-1	Lyt-23	Lyt-123
1	18	17	61	0	39
2	18	14	65	0	35
3	21	17	65	0	35

*) Alter der Mäuse: $2\frac{3}{4}$ Monate. Maus 1 und 2 waren Geschwister. Maus 3 war am gleichen Tag von anderen Eltern geboren worden und stammte aus dem gleichen Käfig.

2.1.2.5 Spezifität des anti-Lyt-1.2-Serums

Wir wiesen bereits früher darauf hin, daß in einigen Testen die Lyse von Zellen mit anti-Lyt-Seren effektiver war als die Lyse mit anti-Thy-1.2-Serum (siehe Tabelle 12). In solchen Fällen erwies sich gewöhnlich das anti-Lyt-1.2-Antiserum in der Lysekapazität dem anti-Thy-1.2 Serum als überlegen. Dieser Effekt ließe sich mit dem Vorkommen von Lyt-1-positiven Zellen erklären, deren exprimierter Thy-1-Gehalt unter der Nachweisgrenze des serologischen Testes liegen würde. Andererseits wäre eine Verunreinigung des anti-Lyt-1.2-Serums mit unspezifischen Antikörpern trotz gründlicher Absorption (siehe C. 1.2.3.1) als Ursache ebenso denkbar. Zur Spezifitätstestung des absorbierten Antiserums wurde dieses mit Thymozyten der Lyt-kongeneten Stämme B6 und B6-Lyt-1.1 absorbiert und dann auf HRS-Milzzellen getestet. Nach Absorption mit B6 (Lyt-1.2-positiv) sollte die ge-

samte Reaktivität gegenüber HRS-Zellen vollständig eliminiert worden sein, während nach Absorption mit B6-Lyt-1.1 (Lyt-1.2-negativ) die Aktivität gegenüber Lyt-1.2-tragenden Zellen noch voll erhalten sein sollte. Die Daten in Tab. 16 bringen die Spezifität des Antiserums klar zum Ausdruck.

Tabelle 16: Spezifitätsnachweis für das anti-Lyt-1.2-Antiserum

Antiserum ^{a)}	Absorption mit b)	zusätzliche Verdünnung für die Absorption	% spezifische Lyse der Milzzellen ^{c)}	
			hr/hr	+ /hr
anti-Lyt-1.2	B6-Thymozyten	1:5	0	0
	B6-Lyt-1.1-Thymozyten	1:5	20	19
	—	1:5	20	20
	—	—	28	27
anti-Thy-1.2			33	23

a) absorbiertes Lyt-1.2-spezifisches Antiserum (1:2 verdünnt)

b) Details der Absorption siehe Methodenteil

c) Verwendung des experimentell absorbierten Antiserums nach einmaligem Einfrieren und Auftauen

Nach Absorption mit B6-Thymozyten wurden keine HRS-Milzzellen mehr lysiert, während nach Absorption mit B6-Lyt-1.1-Thymozyten gute Lyse erfolgte (20 bzw. 19 %) und zwar wurden die gleichen Lysewerte wie mit dem Kontrollserum erhalten, das gleichermaßen verdünnt und behandelt, aber nicht experimentell absorbiert worden war. Antiserum, das weder experimentell absorbiert noch entsprechend verdünnt worden war, führte zu erheblich höheren Lysewerten (28 bzw. 27 %). Die Diskrepanz in der Lyseeffizienz ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die experimentell absorbierten sowie die

Kontrollseren aus arbeitstechnischen Gründen vor dem Test tiefgefroren gelagert waren, und es ist bekannt, daß dabei Seren in höherer Verdünnung (geringere Proteinkonzentration) oft eine stärkere Abnahme in ihrer Aktivität erleiden.

Allem Anschein nach ist folglich die effizientere Lyse des Lyt-1.2-Antiserums im Vergleich zum Thy-1.2-Serum nicht auf eine Verunreinigung des Lyt-1.2-Serums, sondern auf eine weniger effiziente Lyse des Thy-1.2-Serums zurückzuführen, vermutlich infolge des Vorkommens von Zellpopulationen mit geringer Thy-1.2-Antigendichte auf der Zelloberfläche.

2.1.3 Vergleich der Gesamt-Milzzellzahlen

Aus den soeben beschriebenen Experimenten wurde deutlich, daß homozygote hr/hr-Mäuse einer bestimmten Altersgruppe (3 Monate) im Vergleich zu den heterozygoten +/-hr-Tieren eine deutlich herabgesetzte Lyt-1-Population und einen relativen Überschuß an Lyt-123-Zellen besitzen. Eine vergleichende Untersuchung der Gesamtlymphozytenzahl der Milz wurde nun herangezogen, um feststellen zu können, ob Defizienz und Überschuß nur relativ oder zusätzlich auch absolut waren. Bei den getesteten Mäusen waren routinemäßig das Körpergewicht, das Milzgewicht und die Zahl der frei dissoziierbaren Zellen bestimmt worden. Die Daten dieser vergleichenden Analyse sind in Tab. 17 zusammengefaßt.

Das Gewicht von Mäusen beider Genotypen war vergleichbar, wenn man das Gewicht der Behaarung bei den heterozygoten Tieren in Rechnung stellt (ca. 1 - 2 g). Auch in der Altersgruppe 7 - 10 Monate war das Gewicht von Mäusen beider Genotypen ähnlich, wenn man davon absieht, daß einige wenige heterozygote Individuen den Mittelwert etwas erhöhten.

Das Milzgewicht und die Zahl frei dissoziierbarer Zellen aus der Milz waren in hr/hr-Tieren im Vergleich zu den Heterozygoten geringfügig erhöht mit einem Faktor von 1,3

bzw. 1,2. Die Erhöhung schien sich auf T- als auch auf B-Zellen zu beziehen, da der Prozentsatz von T- und B-Zellen in beiden Genotypen gleich war. Auch wenn man die leicht erhöhte Gesamtzahl der Milzlymphozyten von homozygoten gegenüber den heterozygoten Tieren in Rechnung stellt, so wird doch deutlich, daß homozygote Milzen, in absoluten Zahlen ausgedrückt, weniger Lyt-1- und mehr Lyt-123-Zellen als vergleichbare heterozygote Milzen besitzen.

Tabelle 17: Vergleichende Charakterisierung von HRS-Milzen

Alter der Mäuse (Monate)	Körpergewicht (g)		Milzgewicht (mg)		Frei dissoziierbare Zellen pro Milz ($\times 10^{-6}$)	
	hr/hr	+/hr	hr/hr	+/hr	hr/hr	+/hr
1-1.5	17 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	125 $\pm$ 8	103 $\pm$ 7	169 $\pm$ 13	138 $\pm$ 13
2-2.5	22 $\pm$ 1	24 $\pm$ 1	145 $\pm$ 8	102 $\pm$ 8	165 $\pm$ 8	145 $\pm$ 12
3-3.5	24 $\pm$ 0,2	27 $\pm$ 0,2	134 $\pm$ 1	106 $\pm$ 1	160 $\pm$ 7	128 $\pm$ 2
7-10	27 $\pm$ 0,1	34 $\pm$ 0,3	180 $\pm$ 2	157 $\pm$ 3	220 $\pm$ 4	194 $\pm$ 5

2.1.4 Untersuchungen an homozygoten HRS-+/-Mäusen als Kontrollgruppe

Die bei heterozygoten Mäusen der Altersgruppe IV (7 - 10 Monate) festzustellende Umverteilung der T-Zellsubpopulationen in der Milz wies entweder auf einen Einfluß der hr-Mutation im heterozygoten Zustand hin, oder aber dieses Verhalten war Ausdruck eines normalen Alterungsprozesses in den HRS-Tieren. Die Klärung dieser Frage sollte eine Untersuchung des Lyt-Profiles an Milzen von homozygoten +/-Tieren bringen. Die dazu benötigten HRS-Mäuse des Genotyps ++ wurden uns von den Jackson Laboratories zur

Verfügung gestellt. Im Laufe der Experimente mußten wir aber feststellen, daß die erhaltenen Tiere keine reine +/-Linie (vgl. hierzu Diskussion) repräsentierten, da im Verlauf von Kreuzungen unbehaarte Nachkommen auftraten. Die im folgenden diese Tiere betreffenden Resultate gelten daher nur mit Vorbehalten und werden von uns aus diesem Grunde als preliminär betrachtet.

Eine Aufstellung der serologisch ermittelten Lyt-Subsetproportionen in Milzen dieser Mäuse der Altersgruppen II - IV ist in Tab. 18 zu sehen. Eine Disproportion der T-Zellsubsets, die mit der Umverteilung in +/-Tieren vergleichbar wäre, trat nicht zu Tage. Dagegen war ein schwacher, altersabhängiger Anstieg der Lyt-1- und eine Abnahme der Lyt-123-Population zu beobachten, sodaß die Zahl der Lyt-1-Zellen die der Lyt-123-Zellen übertraf. Damit wäre ein Indiz gegeben, daß sich die Disproportion der Lyt-Subpopulationen in alten Heterozygoten (+/hr) der Gruppe IV in Abb. 6 möglicherweise auf eine Penetranz des hr-Gens zurückführen ließe.

Tab. 18: Altersabhängige Entwicklung der Lyt-Sets in Milzen von homozygoten +/-Kontrolltieren

Alter der Milz- zellen in Mona- ten (Gruppe)	% spezifische Lyse		Lyt-Setrepräsentation (% Lyt ⁺)		
	Thy-1 ⁺ - Zellen	Lyt ⁺ - Zellen	Lyt-1	Lyt-23	Lyt-123
2 - 2.5 (II)	22±5 ^{*)}	20±4	51±4	0	49±4
3 - 5 (III)	22±4	24±5	50±1	0	50±1
8 - 10 (IV)	23±5	28±6	54±7	5±3	41±7

^{*)} Mittelwerte ± SEM von 3 Mäusen in Gruppe II und je 4 Mäusen in den Gruppen III und IV.

2.2 Serologische Charakterisierung der Lymphknoten von hr/hr-Mäusen

Aus den bisher dargestellten Experimentalergebnissen wurde deutlich, daß in Milzen der verschiedenen HRS-Genotypen altersabhängig relative und absolute Unterschiede, den Anteil einzelner T-Zellsubpopulationen betreffend, gemessen werden konnten. Es stellte sich nun die Frage, ob die gefundene altersabhängige T-Zelldisproportion nur auf die Milzzellpopulation beschränkt vorkam, oder auch in anderen lymphoiden Organen nachzuweisen war. Für die Untersuchung der T-Zellpopulation in Lymphknoten wurden inguinale, axilläre, cervikale und mesenteriale Lymphknoten vereint.

2.2.1 Enumeration der T-Zellpopulation

Lymphknoten von hr/hr- und +/-hr-Mäusen unterschieden sich nicht wesentlich in ihrem Gehalt an Thy-1-positiven Zellen (Tab. 19). Deren Zahl nahm mit dem Alter der Tiere zu.

Tabelle 19: Bestimmung der Proportionen von T-Zellen in Lymphknoten von HRS-Mäusen^{a)}

Alter der Mäuse in Monaten (Gruppe)	Genotyp der Zellen	% spezifische Lyse		Dissoziierbare Zellen (x 10 ⁻⁶)
		Thy-1 ⁺ -Zellen	Lyt ⁺ -Zellen	
1 - 2.5 (I)	hr/hr	31±5 ^{b)}	29±6	71±14
	+hr	25±3	23±7	62± 8
3 - 4 (II)	hr/hr	44±4	41±4	86± 7
	+hr	42±3	42±4	64± 7
5 - 9 (III)	hr/hr	48±2	47±1	82± 8
	+hr	52±4	48±2	58± 6

a) Resultate von Untersuchungen an vereinten inguinalen, axillären, cervikalen und mesenterialen Lymphknoten.

b) Mittelwerte ± SEM von jeweils 6 Mäusen in Altersgruppe I, je 3 Mäusen in Gruppe II und je 2 Mäusen in Gruppe III.

Ebenso war der Prozentsatz von Lyt-positiven T-Zellen in Lymphknoten beider Genotypen vergleichbar und stieg altersabhängig an. Da Lymphknoten von homozygoten Mäusen gegenüber den heterozygoten, insbesondere von einem Alter von drei Monaten an, eine geringfügig erhöhte Zahl frei dissoziierbarer Zellen aufwiesen, zeigten sie zwar keine Erhöhung der Relativ-, wohl aber der Absolutwerte der T-Zellen.

2.2.2 Bestimmung der Lyt-Subsets

Einen Überblick über die Verteilung der T-Zellsubpopulationen in Lymphknoten von hr/hr- und +/-hr-Mäusen ist der Abb. 7 zu entnehmen. In jungen hr/hr-Mäusen (1 - 2,5 Monate) ist die Lyt-1-Population zugunsten der Lyt-123-Population geringfügig vermindert im Vergleich zu gleichaltrigen +/-hr-Kontrollen ($p < 0,05$). Dagegen entspricht die Subsetverteilung von hr/hr-Tieren von einem Alter von drei Monaten an der von +/-hr-Geschwistern.

2.3 Serologische Charakterisierung der Thymozyten von hr/hr-Mäusen

Thymozyten bestehen zu 90 - 95 % aus "unreifen" Zellen, die in der Rinde des Thymus lokalisiert sind, und zu etwa 5 - 10 % aus "reifen" Zellen, die im Mark vorkommen. Beide Gruppen von Zellen lassen sich aufgrund mehrerer Merkmale unterscheiden (Abb. 2 und Ref. 24).

2.3.1 H-2-Expression

Mäuse des AKR-Stammes entwickeln in ihrem ersten Lebensjahr zu einem hohen Prozentsatz eine Leukämie, die sich im Thymus dieser Tiere manifestiert (Thymombildung, Ref. 149). In präleukämischen AKR-Mäusen zeigen die Thymozyten nach etwa 6 Monaten eine erhöhte Expression des Oberflä-

chenmarkers H-2 und eine verminderte Expression von Thy-1 (150). Dieser Befund läßt sich möglicherweise auf eine Atrophie der Rinde aufgrund einer prozentualen Abnahme der kortikalen Thymozyten (151) zurückführen. Da eine entsprechende Veränderung nicht bei Thymozyten von Leukämieresistenten Mäusen, wie z.B. B6, gefunden wurde, vermutete man einen Zusammenhang zwischen der H-2-Dichte der Zellen und der Leukämieentwicklung der Tiere.

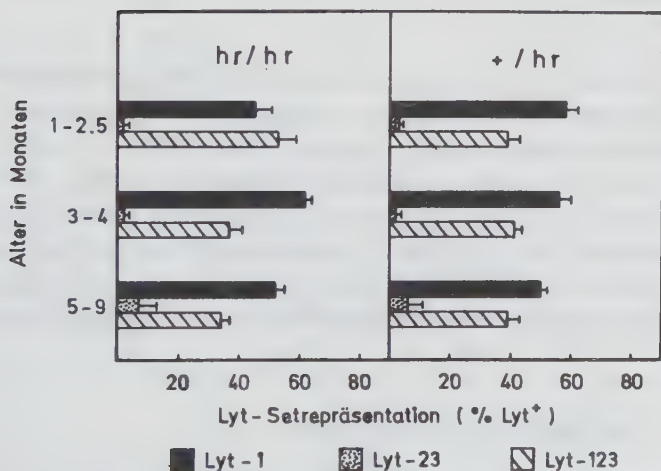


Abb. 7: Altersabhängige Lyt-Subsetverteilung in Lymphknoten von hr/hr- und +/hr-Mäusen
Für die Zahl der getesteten Mäuse vgl. Legende zu Tab. 19.

Wir haben Thymozyten der Genotypen hr/hr, +/-hr und +/+ zunächst auf die Expression von H-2-Antigenen hin untersucht. Dazu wurden Titrationen mit steigenden Verdünnungen von anti-H-2^k-Alloantiserum vorgenommen und daraus die jeweiligen Titer (50 % Lyse der Zellen) graphisch ermittelt.

In Abb. 8 wurde der Antiserumtiter in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse aufgetragen. Bis zum Alter von ungefähr 4 Monaten exprimierten Thymozyten der Mäuse aller Genotypen H-2-Antigen in ähnlichem Umfang auf ihrer Oberfläche. Mit steigendem Alter begann das Ausmaß der H-2-Expression jedoch zu variieren, und zwar in allen Genotypen. Dabei war in Einzelfällen die Dichte der auf den Zellen exprimierten H-2-Antigene gegenüber der Expression in jungen Tieren auf das 5fache erhöht.

Somit zeigten HRS-Mäuse ähnlich wie AKR-Mäuse Veränderungen in der H-2-Konzentration auf Thymozyten, die Leukämieresistente B6-Mäuse nicht zeigten. Die Tatsache, daß Thymozyten aller drei Genotypen die Veränderung in ähnlichem Umfang aufwiesen, läßt allerdings einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der erhöhten H-2-Expression in gealterten HRS-Thymozyten und der Tumorentstehung in alten homozygoten Mäusen zumindest in diesem Mausstamm als fraglich erscheinen.

2.3.2 Repräsentation von Lyt-Sets

Mit diesen Versuchen sollte geklärt werden, ob die oben dargestellte erhöhte Expression von Oberflächen-H-2 auf Thymozyten von alten Mäusen (6 - 10 Monate) im Vergleich zu jungen Tieren (1 - 3 Monate) auf eine anteilmäßige Erhöhung der "reifen" Thymozyten des Marks zurückzuführen war. Dies wiederum würde den Verdacht auf frühzeitige cortikale Atrophie, so wie sie auch im AKR-System beobachtet wurde, erhärten. Wir haben daher die Lyt-Subsets im Thymus von Mäusen der Altersstufen 3 Monate und 8 - 9 Monate bestimmt (Tab. 20).

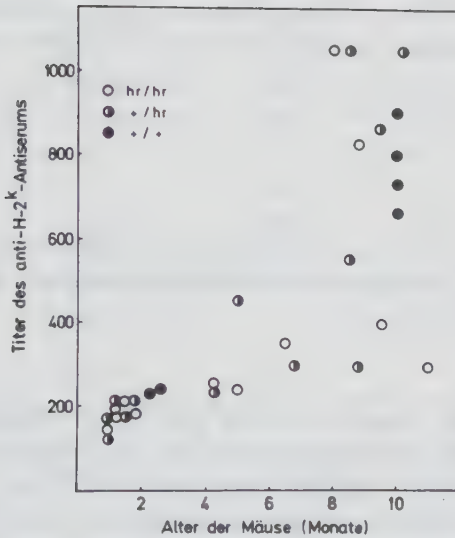


Abb. 8: Altersabhängigkeit der Expression von $H-2^k$ auf Thymozyten von hr/hr-, +/hr- und +/+ -Mäusen

Die Thymozyten wurden mit anti- $H-2^k$ -Antiserum (steigende Verdünnungen) und Meerschweinchenkomplement (Verdünnung 1:4) im Einstufentest inkubiert, und die Zahl toter Zellen wurde mikroskopisch bestimmt. Die Antiserumverdünnung, die 50 % Lyse bewirkte, wurde als Titer in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse aufgetragen.

Tabelle 20: Prozentuale Verteilung der Lyt-Sets im Thymus von HRS-Mäusen

Alter der Mäuse in Monaten	Genotyp der Zellen	% spezifische Lyse ^{*)}		Lyt-Setrepräsentation (% Lyt ⁺)		
		Thy-1 ⁺ -Zellen	Lyt ⁺ -Zellen	Lyt-1	Lyt-23	Lyt-123
3	hr/hr	94	83	0	0	100
	+ /hr	94	84	0	0	100
8 - 9	hr/hr	85	83	14	0	86
	+ /hr	88	86	10	0	90

^{*)} ermittelt durch mikroskopische Auszählung im Einstufen-Zytotoxizitätstest

Wie erwartet, waren im Thymus von jungen HRS-Mäusen ca. 100 % der Lyt-positiven Zellen der Lyt-123-Population zuzurechnen. Nur im Thymus alter Mäuse war ein kleiner Prozentsatz von Lyt-1-Zellen feststellbar. Damit scheint der Prozentsatz von reifen Zellen sowohl in 8 - 9 Monate alten hr/hr- als auch in +/hr-Thymozyten erhöht zu sein.

2.4 Untersuchungen zum Gehalt an Autoantikörpern im Serum unbehandelter Mäuse

Schließlich sollte die Frage geprüft werden, ob die Reduktion einer Subpopulation mit dem Lyt-1-Phenotyp in hr/hr-Mäusen die Folge einer teilweisen Eliminierung der Subpopulation durch Autoantikörper darstellt. So war von NZB-Mäusen berichtet worden, daß Autoantikörper für eine verminderte Präsenz von Suppressorzellen verantwortlich seien (152).

Wir testeten daher das Serum von unbehandelten Mäusen

(NMS) beider Genotypen verschiedener Altersstufen auf ihren Gehalt an Autoantikörpern gegen Thymozyten und Milzzellen von 1 - 2 Monate alten Tieren (Tab. 21). Es zeigte sich, daß Serum von hr/hr-Mäusen gegen Thymozyten keine höhere Lyseaktivität erkennen ließ als Serum von +/-hr-Mäusen, und weiter, daß beide Seren im Vergleich zu dem Serum von gleichaltrigen B6-Mäusen keine erhöhte Lysekapazität besaßen. Mit zunehmendem Alter der Serumdonoren wurde die lytische Aktivität geringer, eine Tendenz, die bei Seren von hr/hr-Mäusen stärker hervortrat als bei denen von +/-hr-Tieren. Heterozygote +/-hr-Milzzellen wurden durch das Serum von hr/hr- und +/-hr-Mäusen nicht lysiert.

Tabelle 21: Autoantikörpergehalt im Serum von hr/hr- und +/-hr-Mäusen mit Spezifität für Thymozyten und Milzzellen

NMS-Donor ^{a)}		% spezifische Lyse ^{b)}			
Alter	Genotyp	Thymus			Milz
		1 10	1 20	1 40	1 5
1 - 1.5	hr/hr	60±6 ^{c)}	49±7	34±9	0,3
	+/-hr	56±9	49±8	34±10	0
2 - 2.5	hr/hr	54±9	44±9	21±8	
	+/-hr	55±6	46±7	35±8	
3 - 3.5	hr/hr	13±3		6±2	0
	+/-hr	32±8		15±5	0
	C57BL/6	49±4			

a) Das Serum wurde entweder am Tage der Gewinnung oder in wenigen Fällen zu einem späteren Zeitpunkt nach Einfrieren auf -70°C verwendet.

b) getestet auf Thymozyten (Einstufentest, mikroskopische Auszählung) und Milzzellen (Zweistufentest, ⁵¹Cr-Freisetzung) von 1 - 2 Monate alten +/-hr-Mäusen.

c) Mittelwerte ± SEM von 3 - 5 NMS-Donoren pro Gruppe.

Wir schließen aus diesen Untersuchungen, daß die Veränderungen der Lyt-Subsets im HRS-System wahrscheinlich nicht auf eine Störung der humoralen Immunität zurückzuführen ist.

3. Charakterisierung der Milzzellen von hr/hr-Mäusen anhand ihrer funktionellen Eigenschaften in vitro

Fassen wir die bisher beschriebenen Resultate zusammen, so läßt sich feststellen, daß sich die beiden Genotypen von HRS-Mäusen hr/hr und +/hr hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer T-Zellpopulation altersabhängig in Bezug auf die Expression der Lyt-Differenzierungsmarker vor allem in der Milz voneinander unterscheiden. Hr/hr-Milzen zeigen im Vergleich zu den Milzen heterozygoter Tiere nach etwa drei Monaten eine Defizienz der Lyt-1-Subpopulation und damit einhergehend eine erhöhte Lyt-123-Population. Es war nun naheliegend, die serologischen Befunde durch funktionelle in vitro-Teste zu ergänzen, um weitere Aufschlüsse über das unterschiedliche Verhalten beider Genotypen zu gewinnen. Es bestand auch die Aussicht, die bisher gewonnenen Resultate durch von der Serologie unabhängige Testparameter zu erhärten. Außerdem sollte es möglich sein, eventuell Hinweise auf die Art des vorliegenden Defektes zu erhalten.

Prinzipiell läßt sich die Reduktion der Lyt-1-Population und der gekoppelte Anstieg der Lyt-123-Population in zweierlei Hinsicht erklären: Einmal wäre es denkbar, daß nur eine T-Zellsubpopulation, entweder die Lyt-1- oder Lyt-123-Population, in ihrer Entwicklung gestört ist, woraus zwangsläufig eine Verschiebung der prozentualen Repräsentation der anderen Subpopulationen resultieren würde. Alternativ könnte aber auch eine Differenzierungsstörung beider Subpopulationen, Lyt-1 und Lyt-123, vorliegen.

27

Eine weitere Frage, die mit diesen Versuchen angegangen werden sollte, war die Frage nach der Spezifität bzw. dem Ausmaß des Defektes. Es könnte die Differenzierung von allen Lyt-1-Zellen gestört sein, oder aber spezielle Untergruppen innerhalb der Lyt-1-Population könnten in ihrer Entwicklung beeinträchtigt sein. In gleichem Sinne könnten entweder alle Lyt-123-Zellen in vermehrtem Ausmaß vorkommen, oder es könnten spezielle Untergruppen verstärkt hervortreten. Wir konzentrierten uns aus praktischen Gründen auf die Untersuchung von bisher in der Literatur beschriebenen Funktionen der Lyt-1-Klasse zur Klärung dieser anstehenden Frage, da die Lyt-1-Zellen, nicht aber die Lyt-123-Zellen, mit heutigen Methoden angereichert werden können.

3.1. Mitogene Stimulierung mit Con A und LPS

Als Mitogene werden Substanzen bezeichnet, die Zellen polyklonal zu DNA-Synthese und Zellteilung anregen. Ihre Wirkung wird durch die Messung der Inkorporation von ^3H -Thymidin in die zelluläre DNA getestet. Man kennt T-Zell-stimulierende Mitogene wie z.B. Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA), zwei Pflanzenlektine mit Kohlehydratspezifität (153), und B-Zellmitogene, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien (154). Es häufen sich die Hinweise, daß Con A und PHA unterschiedliche T-Zellsubgruppen stimulieren (155). Con A scheint ein breiteres Spektrum von T-Zellen zu induzieren als PHA (156 - 158). Man konnte zeigen, daß angereicherte Zellen der Lyt-1- und Lyt-23-Population mit Con A gleich gut stimuliert wurden wie die unseparierte Gesamt-T-Zellpopulation, die zusätzlich Lyt-123-Zellen enthielt (78). Dagegen wurde gefunden, daß PHA vornehmlich "unreife" T-Lymphozyten (158) bzw. Lyt.123-Zellen stimuliert (159).

Milzzellen von 3 - 4 Monate alten Mäusen beider Genotypen wurden mit einer ansteigenden Konzentrationsreihe von Con A

oder LPS 48 Stunden lang in vitro kultiviert. Danach wurde die DNA-Synthese gemessen. In Abb. 9 sind die Ergebnisse in Form einer Dosis-Antwort-Kurve dargestellt. Sowohl die Milzzellen von hr/hr- als auch die von +/-hr-Mäusen ließen sich mit Con A in der gleichen Dosisabhängigkeit in ähnlichem Ausmaß stimulieren. Auch die Behandlung mit LPS führte zu gleichen Ergebnissen in beiden Milzzellpopulationen. Diese Resultate stehen in Einklang mit dem serologischen Befund eines unveränderten Verhältnisses von T- und B-Zellen in Milzen beider Genotypen.

3.2 Mitogene Stimulierung mit PHA

Milzzellen von Mäusen beider Genotypen der Altersstufe 1 - 2 Monate (ohne feststellbare Subsetumverteilung) und $3\frac{1}{2}$ Monate (mit veränderter Subsetverteilung) wurden mit steigenden Mengen PHA 72 Stunden lang inkubiert. Am Ende dieser Zeitspanne, die in Vorversuchen als optimal ermittelt worden war, wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in die Zellen gemessen. Abb. 10 illustriert die Stimulierung der HRS-Zellen in Abhängigkeit von der Mitogendosis. In jungem Alter der Mäuse ließen sich die Milzzellen beider Genotypen ähnlich gut zu DNA-Synthese stimulieren. $3\frac{1}{2}$ Monate alte homozygote hr/hr-Zellen hingegen, die, wie wir oben zeigen konnten, einen zweifachen Überschuß an Lyt-123-Zellen besitzen, antworteten etwa doppelt so gut auf das Mitogen wie die ihnen entsprechenden heterozygoten +/-hr-Zellen. Einhergehend mit der Änderung der Lyt-123-Proportionen mit zunehmendem Alter der Tiere (Übergang 2 zu $3\frac{1}{2}$ Monate) nimmt die Stimulierbarkeit der Zellen durch PHA in hr/hr-Milzen zu und in +/-hr-Milzen dagegen ab.

Auf den Mangel an einer reinen HRS-+/+ -Linie war bereits früher hingewiesen worden (siehe C. 2.1.4), sodaß wir diese Kontrolltiere, die auch in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse gewesen wären, in unsere Experimente nicht

mit aufgenommen haben. Zellen von 3 - 4 Monate alten B6-H-2^k-Mäusen wurden in Paralleltesten eingesetzt, um die Testsysteme zu überprüfen. B6-H-2^k-Milzzellen ließen sich in gleichem Ausmaß mit der gleichen Dosisabhängigkeit wie heterozygote +/hr-Zellen mit PHA stimulieren.

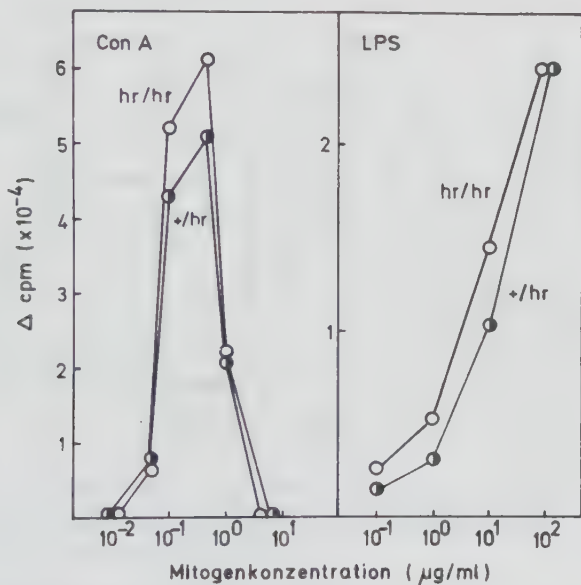


Abb. 9: Mitogene in vitro-Stimulierung von hr/hr- und +/hr-Milzzellen der Altersstufe 3 - 4 Monate mit Con A und LPS

5×10^5 Milzzellen wurden mit den angezeigten Mitogenkonzentrationen für 48 Std. kultiviert. Anschließend wurde ihre DNA-Syntheseleistung bestimmt. Die cpm in den unstimulierten Kontrollkulturen betrugen für hr/hr-Zellen 3240 und für +/hr-Zellen 2990.

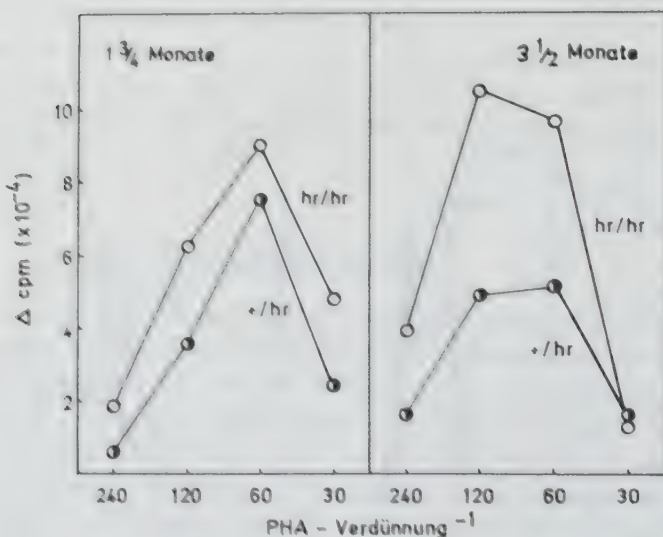


Abb. 10: Mitogene in vitro-Stimulierung von hr/hr - und $+ / hr$ -Milzzellen mit PHA

2×10^5 Milzzellen und steigende Konzentrationen einer Konzentrationsreihe von PHA wurden kokultiviert. Nach 72 Stunden wurde die DNA-Synthese der Zellen gemessen. Die cpm in den unstimulierten Kontrollkulturen betrugen in der Altersgruppe 1 3/4 Monate für hr/hr -Zellen 6690, und für $+ / hr$ -Zellen 1370, und in der Altersgruppe 3 1/2 Monate für hr/hr -Zellen 4360 und für $+ / hr$ -Zellen 1250.

Die Ergebnisse der PHA-Stimulierung scheinen somit die altersabhängige, bisher rein serologisch charakterisierte Disproportion der T-Zellsubpopulationen in Milzen von Mäusen beider Genotypen (hr/hr und +/hr) ebenfalls widerzuspiegeln.

3.3. Primärantwort gegen das T-Zell-abhängige Antigen SRBC

Seit den klassischen Arbeiten von Clayman (160), Mitchison (161), Rajewsky (162) und Raff (163) ist bekannt, daß bei der Immunantwort gegen verschiedene Antigene T-Lymphozyten Antigen-spezifisch B-Lymphozyten zu Differenzierung in Antikörper-sekretierende Plasmazellen induzieren. Eine wesentliche Voraussetzung dieser T-Zellhilfe ist, daß die Antigendeterminanten, welche von den Helfer-T-Zellen und den B-Zellen erkannt werden, auf demselben Molekül lokalisiert sind. Verwendet man als T-Zell-abhängiges Antigen Schafserythrozyten, so können die Antikörper-sezernierenden Zellen, deren Spezifitäten gegen Schafserythrozyten gerichtet sind, mit Hilfe von Komplement im Plaquetest nach Jerne (126) sichtbar gemacht werden. Sie entwickeln auf einem Erythrozytenrasen Lysehöfe und werden daher in Anlehnung an eine analoge Technik der Phagengenetik Plaquebildende Zellen (PFC) genannt.

Milzzellen von 3 - 4 Monate alten homozygoten und heterozygoten Mäusen wurden in einer Konzentrationsreihe mit einer konstanten Zahl Schafserythrozyten unter Mishell-Dutton Bedingungen (113) kultiviert. Nach fünf Tagen wurden diejenigen Antikörper-bildenden Zellen, deren Spezifitäten gegen Schafserythrozyten gerichtet waren, als Plaque-bildende Zellen ausgezählt. Abb. 11 veranschaulicht dieses Experiment. Zunächst fällt auf, daß sich HRS-Milzzellen mit Schafserythrozyten generell nur in geringem Maße stimulieren lassen. Die zur Kontrolle des Testsystems ermittelten PFC-Werte für Milzzellen von B6-H-2^k-Mäusen (ebenfalls H-2^k-

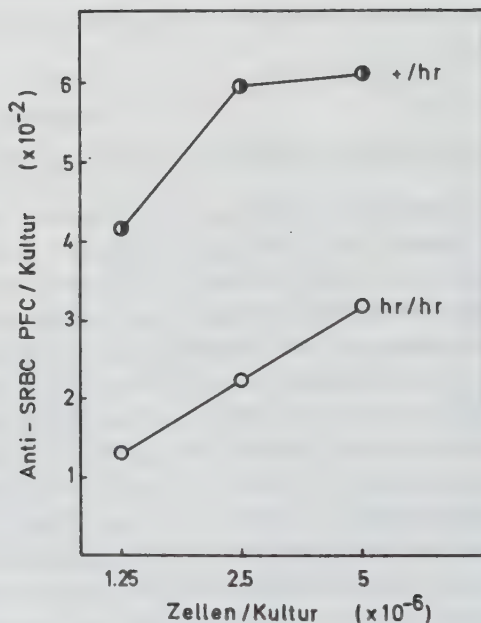


Abb. 11: Primärantwort von hr/hr- und +/-hr-Milzzellen gegen Schafserthrozyten

Zunehmende Mengen von Milzzellen wurden 5 Tage lang mit 3×10^6 SRBC oder Medium zur Kontrolle kokulti-
viert. Danach wurden die spezifischen Plaque-bilden-
den Zellen als Differenz zwischen den PFC in SRBC-
stimulierten und unstimulierten Kulturen ermittelt.
Die PFC in Kontrollkulturen von hr/hr- und +/-hr-
Zellen stiegen von 50 PFC pro $1,25 \times 10^6$ Zellen auf
133 bzw. 120 PFC pro 5×10^6 Zellen an.

Haplotyp) liegen deutlich höher: 480 Plaques bei $1,25 \times 10^6$ Milzzellen, 1060 Plaques bei $2,5 \times 10^6$ Milzzellen und 2270 Plaques bei 5×10^6 Milzzellen. Darüberhinaus kommt jedoch klar zum Ausdruck, daß homozygote (hr/hr) Milzzellen nur etwa halb so viele Plaque-bildende Zellen produzieren wie vergleichbare heterozygote (+/hr) Zellen. Diese Resultate harmonisieren daher gut mit dem serologischen Befund einer reduzierten Lyt-1-Population und damit einer reduzierten Helferfunktion in hr/hr-Milzen. Auch die serologisch ermittelte, simultane Erhöhung der Lyt-123-Population, Zellen, die funktionell als Vorläufer von Suppressorzellen (94) oder Produzenten von Suppression-amplifizierenden Faktoren (98) angesehen werden, widerspricht obigem Ergebnis nicht. Da andererseits gezeigt werden konnte, daß Milzzellen beider Genotypen auf einen Stimulus mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll vergleichbar antworten, war ein Indiz gegeben, daß der beobachtete Defekt in der Primärantwort gegen Schafserthrozyten im T-Zellkompartiment der Milz begründet ist. (Letztere Versuche wurden in Zusammenarbeit von Dr. P. Kincade, Sloan-Kettering Institute, durchgeführt.)

3.4 Allogenetische Stimulierung von HRS-Milzzellen

Mehrere Fragen traten nun in den Mittelpunkt des Interesses: Resultiert die Disproportion der T-Zellen aus Differenzierungsdefekten sowohl von Lyt-1- als auch von Lyt-123-Zellen, oder ist sie die Folge einer Differenzierungsstörung nur einer Population, entweder von Lyt-1 oder Lyt-123, und der dadurch bedingten prozentualen Verschiebung der anderen Populationen? Sind alle Zellen einer Subpopulation Lyt-1 bzw. Lyt-123 reduziert bzw. vermehrt vorhanden, oder trifft dies nur für diskrete Untergruppierungen innerhalb der Lyt-1- oder Lyt-123-Population zu? Und schließlich, welche von den bisher bekannten speziellen Untergruppen innerhalb der Lyt-Sets sind in ihren mengenmäßigen Anteilen verschoben, falls aufgezeigt werden kann, daß nicht alle Zellen einer Lyt-Population von dem Defekt betroffen sind?

Mit den folgenden Experimenten wurde der Versuch unternommen, Hinweise zu erhalten, die zur Beantwortung der skizzierten Fragen geeignet sind.

Werden Lymphozyten eines beliebigen Mäusestammes lethal mit Röntgenstrahlen behandelt und danach mit Lymphozyten eines anderen, H-2-Komplex-inkompatiblen Stammes kokultiviert, so beobachtet man nach einiger Zeit eine Proliferation und Differenzierung der nicht-bestrahlten Responderzellen zu Killerzellen. Die Proliferation der Responderzellen kann mit Hilfe des Einbaus von radioaktivem ^3H -Thymidin in die DNA der Zellen gemessen werden. Man nennt dieses in der Transplantationsimmunologie häufig verwendete Testsystem gemischte Lymphozytenkultur (MLC) oder gemischte Lymphozytenreaktion (MLR, Ref, 164). Darüberhinaus läßt sich das herangebildete Killerpotential der Responderzellen anhand der Lyse von geeigneten Zielzellen im Zell-vermittelten Zytotoxizitätstest (CML) bestimmen (165). Sowohl MLR als auch CML sind T-Zell-vermittelte Reaktionen und eignen sich daher zum Studium von T-Zellfunktionen.

3.4.1 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Es ist bis heute nicht eindeutig erwiesen, wieviele und welche T-Lymphozyten-Subpopulationen an einer MLR beteiligt sind. Am klarsten liegen die Verhältnisse, wenn sich Responder- und Stimulatorzellen nur in der I-Region des H-2-Komplexes unterscheiden. In diesem Fall werden vorwiegend Lyt-1-Zellen stimuliert (57). Bei Unterschieden im gesamten H-2-Komplex proliferieren nach Bach und Alter (166) hauptsächlich Lyt-1-Zellen oder, gemäß Befunden von Cantor und Boyse (57), außerdem Lyt-23- bzw. Lyt-123-Zellen. Demgegenüber sollen Differenzen in der H-2K/D-Region Lyt-123-Zellen zu DNA-Synthese stimulieren (166).

HRS-Mäuse besitzen den H-2-Komplex vom k-Haplotyp. Da es keinen Stamm mit der Locus-Kombination $K^k I^x D^k$ gibt, wo-

bei x jedes beliebige, von k verschiedene Allel bezeichnet, war es uns nicht möglich, selektiv die Lyt-1-Population von HRS-Milzzellen in ihrer Proliferation gegen I-Region-differente Stimulatorzellen zu charakterisieren. Wir mußten uns daher auf ein suboptimales Testsystem beschränken, in dem die MLR gegen Unterschiede in der H-2K/D-Region (Stimulator: A.TL-Milzzellen) sowie gegen Unterschiede im gesamten H-2-Komplex (Stimulator: A.TH- bzw. BALB/c-Milzzellen) vorgenommen wurde. Die Resultate dieser Experimente sind in Tab. 22 zusammengefaßt. Daraus geht klar hervor, daß Milzzellen von 3 - 4 Monate alten homozygoten (hr/hr) Mäusen gleich gut wie die von heterozygoten (+/hr) Mäusen gegen die drei gewählten Stimulatorzellen proliferierten. Die Proliferation gegen A.TH- und BALB/c-Zellen war ähnlich stark und ungefähr doppelt so hoch wie die gegen A.TL-Zellen, was wegen der zusätzlichen I-Region-Unterschiede dieser Zellen zu erwarten war (57).

Um zu prüfen, ob sich in der MLR reaktive T-Zellen von hr/hr- und +/hr-Abstammung möglicherweise nach ihrer Stimulierung Haplotyp-spezifisch in der Proliferation voneinander unterscheiden, wurden zusätzliche Stimulatorzellen verschiedener Haplotypen getestet. Die Daten in Tab. 23 zeigen, daß das hier nicht der Fall war. Milzzellen von Mäusen beider Genotypen unterschieden sich nicht in ihrem proliferativen Verhalten gegen die willkürlich ausgewählten sechs Stimulatorzellen mit differenten Haplotypen.

In mehreren Experimenten war zur Kontrolle des Testsystems das Proliferationsvermögen von 3 Monate alten B6-H-2^k-Milzzellen bei der Stimulierung mit bestrahlten A.TL-, A.TH- und BALB/c-Milzzellen bestimmt worden. Es zeigte sich, daß es dem der HRS-Milzzellen beider Genotypen entsprach.

Die erhaltenen Resultate lassen sich nun dahingehend interpretieren, daß diejenigen Lyt-Subpopulationen, die für eine MLR verantwortlich sind, in homozygoten (hr/hr) wie in heterozygoten (+/hr) Tieren der getesteten Altersstufe in normalen Mengenverhältnissen vorzuliegen scheinen.

Tabelle 22: Proliferation von HRS-Milzzellen (H-2^k) in der MLC^{a)}

Bestrahlte Stimulatorzellen ^{b)}	H-2 Komplex der Stimulatorzellen			Spezifische Aufnahme von ³ H-Thymidin ^{c)} (cpm x 10 ⁻³)	Aufnahme von
	K	I	D	hr/hr	+ /hr
A.TL	s	k	d	6,8 ± 2,5 ^{d)}	6,1 ± 1,5
A.TH	s	s	d	12,1 ± 5,2	12,7 ± 4,2
BALB/c	d	d	d	12,3 ± 3,1	16,0 ± 3,1

a) $7,5 \times 10^5$ Responderzellen wurden mit der gleichen Zahl von bestrahlten Stimulatorzellen kultiviert. Nach Ablauf von 5 Tagen wurde die DNA-Synthese durch Einbau von ³H-Thymidin bestimmt.

b) Milzzellen, bestrahlt mit 2000 R.

c) berechnet als: cpm (Responder + bestrahlter Stimulator) - cpm (Responder + bestrahlter Responder).
Kontrolle: cpm (Responder + bestrahlter Responder) waren für hr/hr 920 ± 250 und für +/hr 1250 ± 360 .

d) Mittelwerte ± SEM von 4 - 7 Experimenten.

Tabelle 23: Vergleich der Proliferation von HRS-Milzzellen
(H-2^k) gegen bestrahlte Milzzellen von Mäusen
verschiedener Haplotypen^{*)}

Bestrahlte Stimulator- zellen	H-2 Komplex der Stimulatorzellen			Spezifische Aufnahme von ³ H-Thymidin (cpm x 10 ⁻³)	
	K	I	D	hr/hr	+ /hr
A.TL	s	k	d	11,8	10,1
A.TH	s	s	d	26,6	25,0
BALB/c	d	d	d	27,6	28,6
B6	b	b	b	22,6	24,9
B10.S	s	s	s	19,7	21,6
B10.T (6R)	q	q	q	22,3	25,1

^{*)} Für Erläuterungen siehe Fußnote zu Tabelle 22.

Kontrolle: cpm (Responder + bestrahlter Responder) waren
für hr/hr 2000 und für +/hr 3600

3.4.2 Zell-vermittelte Zytotoxizität (CML)

Wie im Falle der MLR, steht auch für die CML nicht immer fest, welche Lyt-Subpopulationen im einzelnen an der Reaktion beteiligt sind. Übereinstimmend wurde jedoch von verschiedenen Arbeitsgruppen gefunden, daß Lyt-1-Zellen mit Lyt-23-Killerzellvorläufern kooperieren, um eine zytotoxische Antwort zu induzieren, wenn sich stimulierende und antwortende Zellen in dem gesamten H-2-Komplex voneinander unterscheiden. Für die zytotoxische Reaktion sind dann Lyt-23-Killereffektorzellen verantwortlich (57,90,166). Bei genetischen Unterschieden der Partner, die nur auf die H-2D- bzw. H-2K-Region beschränkt sind, sind nach neueren Daten Lyt-123-Zellen die Vorläufer der Effektorzellen (166).

Milzzellen von HRS-Mäusen beider Genotypen (3 - 4 Monate alt) wurden gegen bestrahlte Stimulatorzellen mit unterschiedlicher H-2K/H-2D-Region (A.TL-Zellen) und nicht-kompatiblen Gesamt-H-2-Komplex (A.TH-Zellen) in Kultur sensibilisiert. Anschließend wurde am 5. Tag die Lyseaktivität der entstandenen Killerzellen im Zell-vermittelten Zytotoxizitätstest gemessen. Die Daten in Abb. 12 lassen erkennen, daß die zytotoxische Aktivität von hr/hr-Milzzellen der von +/-hr-Zellen ähnlich war.

Zur Überprüfung des Testsystems der CML wurden ebenfalls B6-H-2^k-Milzzellen eingesetzt. Diese hatten unter gleichen Testbedingungen im Vergleich zu Effektorzellen von HRS-Mäusen eine höhere lytische Kapazität (61 % spezifische Lyse von A.TL-Milzzellen und 53 % spezifische Lyse von A.TH-Zellen bei einem Effektor:Zielzellverhältnis von 12:1).

Somit scheinen sich, neben der MLR, auch die in der CML beteiligten T-Zellsubpopulationen in Milzen beider Genotypen nicht wesentlich voneinander zu unterscheiden.

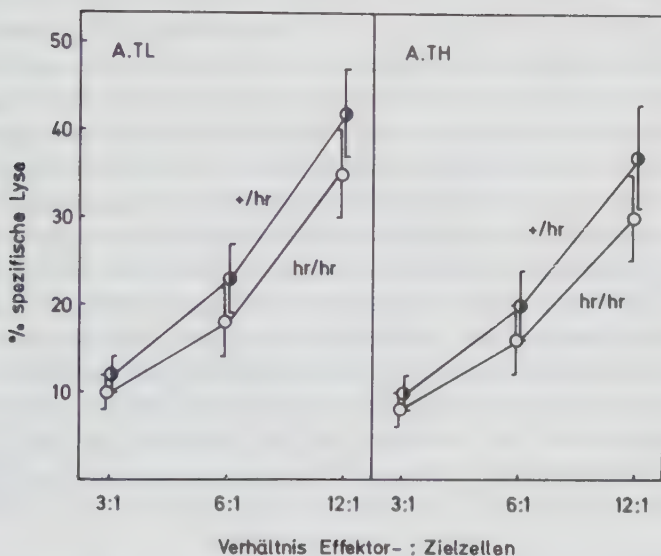


Abb. 12: Zell-vermittelte Zytotoxizität von HRS-Milzzellen (H-2^k)

6×10^6 Responderzellen wurden mit 3×10^6 bestrahlten (2000 R) Stimulatorzellen oder zur Kontrolle mit 3×10^6 bestrahlten Responderzellen kokultiviert. Als Stimulatorzellen dienten Milzzellen von A.TL- und A.TH-Mäusen. Nach Ablauf von 5 Tagen wurde die spezifische Lyse von ^{51}Cr -markierten RLO $\rightarrow$ 1-Zielzellen (H-2^d) bestimmt (Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 - 4 Experimenten).

3.5 Immunologische in vitro-Funktionen von isolierten Lyt-1_i-Zellen

Um die Frage anzugehen, welche funktionelle T-Zellsgruppe in homozygoten hr/hr-Mäusen gestört sein könnte, erschien es uns erforderlich, Untersuchungen an einer isolierten, möglichst reinen Lyt-1- bzw. Lyt-123-Population vorzunehmen. Lyt-123-Zellen können mit bisher zur Verfügung stehenden Methoden nicht isoliert werden. Dagegen ist es möglich, Lyt-1-Zellen selektiv anzureichern. Zu diesem Zweck wurden Milzzellen von hr/hr-sowie von +/-hr-Tieren (3 - 4 Monate alt) mit Antiserum gegen Lyt-2 und Lyt-3 und mit Komplement behandelt. Nach der Abtrennung von B-Zellen und Makrophagen auf Nylonwollsäulen konnte eine angereicherte Lyt-1-Population erhalten werden (94). Diese wurde nun auf zwei dieser Population speziell zugeschriebene Funktionen hin getestet, nämlich der funktionellen Hilfe für B-Zellen und der Induktion von Suppressorzellen bei der Antikörperbildung gegen das Antigen Schafserythrozyten.

Zunächst war es notwendig, die Effizienz der Isolierungsmethode von Lyt-1-Zellen zu überprüfen. Dazu wurde die isolierte Lyt-1-Population im Protein A-Rosettentest auf die Expression der Lyt-1- und Lyt-3 Marker hin untersucht. Aus Tab. 24 wird klar ersichtlich, daß es gelang, Lyt-1-positive Zellen aus Milzen von homozygoten hr/hr-Mäusen zu 76 % sowie von heterozygoten +/-hr-Tieren zu 72 % stark anzureichern. Die Anreicherung der Gesamt-T-Zellen betrug gewöhnlich 75 - 85 % (siehe C. 2.1.2.3). Nur 2 bzw. 7 % der erhaltenen Zellen reagierten auch für den Lyt-3-Marker positiv und entfielen damit auf unvollständig eliminierte Lyt-23- oder Lyt-123-Zellen.

3.5.1 Immune Lyt-1_i-Zellen als Helfer für B-Zellen

Um die Helferaktivität von immunen Lyt-1-Zellen (Lyt-1_i)

aus Milzen von Tieren, die mit Schafserythrozyten immunisiert worden waren, zu ermitteln, wurden diese zusammen mit isolierten B-Zellen (gewonnen durch Behandlung von Milzzellen mit anti-Thy-1.2-Serum und Komplement) und Schafserythrozyten kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Plaquebildenden Zellen ausgezählt. Abb. 13 gibt einen Überblick über die erhaltenen Daten. Mit beiden B-Zellpräparationen (aus Milzen homozygoter hr/hr- und heterozygoter +/hr-Mäuse) wurden bei steigender Konzentration von Lyt-1_i -Zellen eine zunehmende Zahl Plaquebildender Zellen erhalten. Immune homozygote Lyt-1_i -Zellen induzierten in den verwendeten Konzentrationen (1×10^5 und 5×10^5) nach Zugabe zu hr/hr- und +/hr-B-Zellsuspensionen ebenso viele Plaquebildende Zellen wie die entsprechenden immunen heterozygoten Lyt-1_i -Zellen. Somit besitzen immune homozygote Lyt-1_i -Zellen eine ähnliche Helferaktivität für isolierte B-Zellen beider Genotypen wie immune heterozygote Lyt-1_i -Zellen.

Tabelle 24: Effizienz der Lyt-1 -Zellisolierung^{a)}

Genotyp der Lyt-1_i -Zellen	% spezifische Rosetten ^{b)} mit	
	anti- Lyt-1.2	anti- Lyt-3.2
hr/hr	76	2
+ /hr	72	7

a) Behandlung der Milzzellen mit anti- Lyt-2.2 - und anti- Lyt-3.2 -Antiserum und Kaninchenkomplement mit anschließender Abtrennung der B-Zellen auf Nylonwollsäulen.

b) bestimmt im Protein A-Rosettentest.

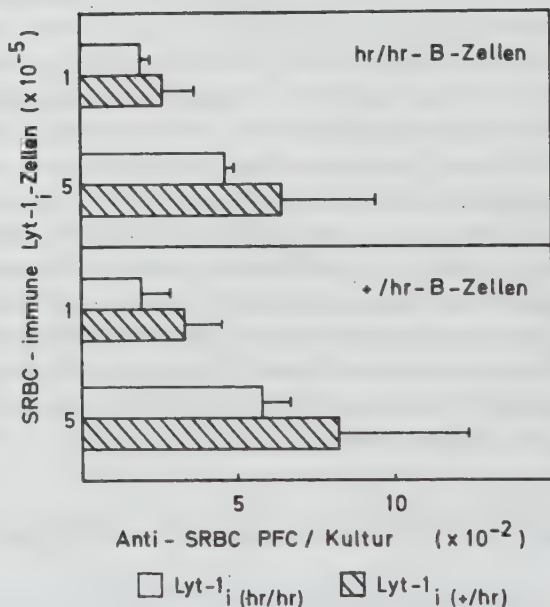


Abb. 13: Helferfunktion von Lyt-1_i-Zellen in der Kooperation mit B-Zellen

Lyt-1_i-Zellen wurden aus Milzzellen von HRS-Mäusen isoliert, die 7 - 14 Tage zuvor mit 10⁸ SRBC immunisiert worden waren, und wurden in den angegebenen Zellzahlen mit 3 x 10⁶ B-Zellen (isoliert aus unbehandelten HRS-Milzen durch Behandlung mit anti-Thy-1.2-Antiserum und Komplement) in verschiedenen Kombinationen in Gegenwart von 3 x 10⁶ SRBC kultiviert. Nach 5 Tagen wurde die Zahl der PFC ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 3 Experimenten.

PFC der B-Zellen ohne Zugabe von Lyt-1_i-Zellen:

hr/hr: 52 ± 32, +/hr: 68 ± 40.

PFC von 5 x 10⁵ Lyt-1_i-Zellen allein: hr/hr: 5, +/hr:

3.5.2 Immune Lyt-1_i-Zellen als Induktoren von Suppressorzellen

In Experimenten der Arbeitsgruppen um Cantor und Gershon war gezeigt worden, daß durch die Zugabe von Lyt-1-Zellen aus Mäusen, die mit Schafserythrozyten in hoher Dosis (1×10^8) immunisiert worden waren (Lyt-1_i), zu unbehandelten Milzzellsuspensionen von Tieren des gleichen Stammes Antigen-spezifisch die Entstehung von Plaque-bildenden Zellen unterdrückt wurde (94,125). Dieser Effekt wurde dahingehend interpretiert, daß immune Lyt-1_i-Zellen die Differenzierung von nicht-immunen Lyt-123-Zellen zu Suppressorzellen induzieren. Daraus resultiert, daß die für eine Immunantwort erforderliche Hilfe von T-Helferzellen für die B-Zellen supprimiert wird (Rückkopplungs-Suppressionssystem).

Aus Milzen von $3\frac{1}{2}$ Monate alten HRS-Mäusen, die 7 - 14 Tage vor Versuchsbeginn mit Schafserythrozyten in hoher Dosis immunisiert worden waren, wurde die Lyt-1-Population stark angereichert isoliert und zusammen mit Milzzellen von unbehandelten Mäusen unter Zugabe von Schafserythrozyten 5 Tage lang in Kultur inkubiert (Mishell-Dutton-System, siehe B. 3.6.3). Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden die gebildeten PFC ermittelt. Abb. 14 gibt einen Überblick über die erhaltenen Daten.

Wenn 5×10^5 immune Lyt-1_i-Zellen aus Milzen von homozygoten hr/hr-Mäusen mit 5×10^6 unbehandelten +/-hr-Milzzellen und Schafserythrozyten kokultiviert wurden, entwickelten sich dreimal mehr Plaque-bildende Zellen als nach Zugabe der gleichen Anzahl immuner Lyt-1_i-Zellen von heterozygoten +/-hr-Tieren zu einem zweiten Aliquot der unbehandelten +/-hr-Milzzellsuspension (Abb. 14B). Bei Kokultivierung von 5×10^5 immunen Lyt-1_i-Zellen sowohl von hr/hr- als auch von +/-hr-Tieren mit nicht-immunen homozygoten hr/hr-Milzzellen ergab sich ein ähnlicher Trend (Abb. 14A). Es entwickelten sich im Fall der ersteren Testkombination (Lyt-1_i (hr/hr)

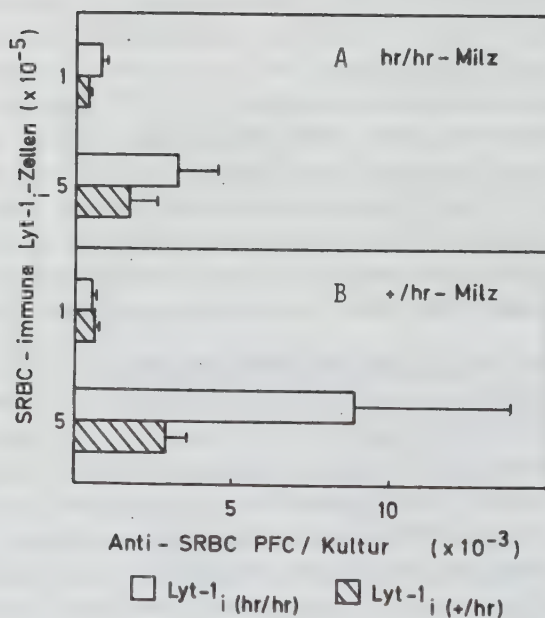


Abb. 14: Untersuchung der Lyt-1_i-Population im Rückkopplungs-Suppressionssystem

Lyt-1_i-Zellen wurden aus Milzzellen von HRS-Mäusen isoliert, die 7 - 14 Tage zuvor mit 10⁸ SRBC immunisiert worden waren, und wurden in den angegebenen Zellzahlen mit 5 x 10⁶ Milzzellen von unbehandelten HRS-Mäusen in verschiedenen Kombinationen in Gegenwart von 3 x 10⁶ SRBC kultiviert. Nach 5 Tagen wurde die Zahl der PFC ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte von 3 Experimenten ± SEM.

PFC der Milzzellen ohne Zugabe von Lyt-1_i-Zellen:
hr/hr: 250±150; +/-hr: 580±220.

PFC von 5 x 10⁵ Lyt-1_i-Zellen allein: hr/hr: 10,
+/hr: 11.

zu hr/hr Milzzellen) ebenfalls mehr Plaque-bildende Zellen, als in der zweiten Kombination (Lyt- 1_i (+/hr) zu hr/hr-Milzzellen). Darüberhinaus war die Zahl der von immunen Lyt- 1_i -Zellen homozygoter hr/hr-Tiere induzierten PFC mit nicht-immunen hr/hr-Milzzellen deutlich kleiner als mit nicht-immunen +/hr-Milzzellen. Außerdem trat eine Dosisabhängigkeit der Induktion Plaque-bildender Zellen zutage, indem 1×10^5 Lyt- 1_i -Zellen in jedem Fall weniger Plaques induzierten als 5×10^5 Lyt- 1_i -Zellen.

Betrachten wir die unter C. 3.5.1 dargestellten Ergebnisse und die soeben geschilderten Befunde im Zusammenhang, dann ergibt sich folgendes Bild: Eine gereinigte Lyt- 1_i -Population von immunen homozygoten hr/hr-Mäusen vermittelt isolierten B-Zellen beider Genotypen eine ähnliche Hilfe wie die entsprechende Population immuner heterozygoter Tiere (Abb. 13). Da andererseits immune homozygote Lyt- 1_i -Zellen in nicht-immunen Milzzellen beider Genotypen mehr Plaques induzierten als immune heterozygote Lyt- 1_i -Zellen in nicht-immunen Milzzellen, könnte man, da auf die gleiche Zellzahl normiert worden war, folgern, daß homozygote im Vergleich zu den entsprechenden heterozygoten Lyt- 1_i -Zellen eine reduzierte Induktionsaktivität für Suppressorzellen besitzen.

D. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob Mäuse des HRS-Stammes, die die Mutation "hairless" (hr) in homozygoter Form tragen und zu einem hohen Prozentsatz im Alter Leukämie entwickeln, Störungen in ihrem T-Zellkompartiment aufweisen und sich aufgrund dessen als Modell zum immunogenetischen Studium der T-Zelldifferenzierung eignen. In einem ersten Schritt und als Ausgangsbasis für die Untersuchung von T-Zellfunktionen wurde in verschiedenen lymphatischen Organen die altersabhängige Entwicklung der Proportionen der bisher bekannten T-Zellsubpopulationen Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123 mit serologischen Methoden bestimmt. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Serologie tatsächlich Hinweise auf eine gestörte Subsetverteilung der T-Zellen vor allem in der Milz der HRS-Mäuse zutage treten ließ, wurden in einem zweiten Schritt verschiedene T-Zellfunktionen in vitro getestet, die Auskunft über das Ausmaß des Defektes und über die betroffene(n) Subpopulation(en) geben sollten. Schließlich wurde die Möglichkeit geprüft, ob sich der Defekt eventuell auf eine übermäßige Produktion von Autoantikörpern zurückführen ließe, die ihrerseits in der Lage wären, bestimmte Subpopulationen zu eliminieren.

1. Serologische Charakterisierung von T-Lymphozyten-Subpopulationen

Da in der vorliegenden Arbeit die Bestimmung der Lyt-Subsets mit serologischen Methoden von fundamentaler Bedeutung war, soll zunächst auf das Testsystem näher eingegangen werden.

Zwei Verfahren können zur Enumerierung von Lyt-Subsets herangezogen werden. In den ursprünglichen Arbeiten von Cantor und Boyse zur Charakterisierung der drei T-Zellsubpopulationen (57) wurden die beiden Lyt-Antiseren

(anti-Lyt-1 und anti-Lyt-2) sequentiell zugegeben, d.h. diejenigen Zellen, die eine Behandlung mit dem einen Lyt-Antiserum und Komplement im ersten Eliminierungsschritt überlebt hatten, wurden in einer zweiten Inkubation mit dem anderen Lyt-Serum und Komplement konfrontiert (sequentielle Antiserumzugabe). Ein Alternativverfahren besteht darin, den Zellen neben dem Komplement die beiden Lyt-Seren in Kombination zuzugeben (kombinierte Antiserumzugabe).

Der letzteren Methode haben wir aus mehreren Gründen den Vorzug gegeben. Wie den Daten in Tab. 6 zu entnehmen ist, war der Zweistufentest von Vorteil. Es resultierten höhere Lysewerte, wenn Komplement zu Antikörper-beladenen Zellen zugegeben wurde, von den überschüssiges Antiserum durch Waschen abgetrennt worden war. Daher wären bei sequentieller Antiserumzugabe vier Zentrifugationsschritte nötig gewesen, während bei kombinierter Antiserumzugabe zwei Waschschritte ausreichten, und so mögliche systematische Fehler reduziert werden konnten. Beide Verfahren hatten in Paralleltesten zu vergleichbaren Ergebnissen geführt (T. Stanton und J. Crowell, Sloan-Kettering Institute, pers. Mitteilung). Auch die Übereinstimmung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse über die Verteilung der Lyt-Subsets im B6-System (Tab. 9 und 11) mit früher veröffentlichten Daten weisen auf die Vergleichbarkeit der mit beiden Testmethoden gewonnenen Resultate hin.

Die drei Lyt-Sets Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123 waren ursprünglich in B6-Mäusen identifiziert und charakterisiert worden. Dieser Mäusestamm eignete sich besonders gut, da Lyt-kongene Tiere und damit optimale Kontrollzellen zur Verfügung standen. In Übereinstimmung mit Cantor und Boyse (57,125) konnten wir zunächst an B6-Milzzellen einen altersabhängigen Anstieg der Lyt-1- und einen Abfall der Lyt-123-Population im untersuchten Zeitraum (Alter 2 - 13 Monate) nachweisen.

Auf diesen Befunden aufbauend wurden die Lyt-Subsetproportionen unter dem Aspekt ihrer ontogenetischen Entwicklung

in lymphatischen Organen von hr/hr-Mäusen im Vergleich zu +/hr- und +/-Kontrolltieren untersucht. Wir konnten in hr/hr-Milzen, im Alter von ungefähr drei Monaten beginnend, eine Störung in der Lyt-Subsetentwicklung aufzeigen. Von diesem Alter an waren in homozygoten hr/hr-Tieren Lyt-1-Zellen statistisch signifikant in geringerer Zahl vertreten als in entsprechenden +/hr-Kontrolltieren und in hr/hr-Milzen der Altersstufe zwei Monate. Parallel dazu war von drei Monaten an in hr/hr-Mäusen die Zahl der Lyt-123-Zellen stark erhöht.

Mit zunehmendem Alter nahm in heterozygoten +/hr-Tieren der Prozentsatz von Lyt-1-Zellen zunächst über den Wert von zwei Monaten hinaus weiterhin zu und der von Lyt-123-Zellen ab, analog der Subsetentwicklung im B6-System. Jedoch wurde auch in +/hr-Milzen eine Umverteilung der Lyt-Subsetproportionen mit gleicher Tendenz wie in drei Monate alten hr/hr-Zellen beobachtet, allerdings erst in einem späteren Lebensabschnitt der Tiere (Abb. 6).

Der Befund einer Verschiebung der Proportionen einzelner T-Zellsubpopulationen in hr/hr-Milzen von einem Alter von drei Monaten an verleiht den von L. Schultz an hr/hr-Tieren im Testsystem der DTH gewonnenen Ergebnissen eine zelluläre Basis (L. Schultz, The Jackson Laboratories, pers. Mitteilung). Nach Untersuchungen von B. Huber (60) und M. Vadas (167) zur DTH von B6-Mäusen auf eine Stimulierung mit Schafserythrozyten bzw. Vogel-Gammaglobulin hin ist die Reaktivität vorwiegend Lyt-1-Zellen zuzuschreiben. L. Schultz bestimmte die DTH in HRS-Mäusen verschiedener Altersstufen in Antwort auf die Applikation von Picrylchlorid. Hr/hr-Mäuse besaßen eine maximale DTH im Alter von 70 Tagen, während in 140 Tage alten Mäusen keine DTH mehr nachweisbar war. Dagegen hatten +/hr-Mäuse eine maximale DTH erst im Alter von 140 Tagen erreicht.

In +/- -Kontrollmilzen ließ sich keine Umkehrung der Proportionen der T-Zellsets mit dem Alter nachweisen (Tab. 18).

In dieser Hinsicht sind Milzzellen von +/+ -Mäusen des HRS-Stammes denen von B6-Mäusen (Tab. 11) und BALB/c-Mäusen (125) ähnlich. Dieser Befund war ein Indiz dafür, daß unvollständige Penetranz des Wildtyp-Allels am hr-Locus und nicht ein natürlicher Alterungsprozess in Mäusen des HRS-Stammes für die Disproportion der Subpopulationen in alten Heterozygoten verantwortlich sein könnte. Ein Einfluß des hr-Allels scheint sich auch in der Tatsache widerzuspiegeln, daß bei einigen Heterozygoten spontan von einem Alter von ungefähr vier Monaten an Haarverlust auftrat, der in Ausnahmefällen zu fast vollständiger Haarlosigkeit führte. Von Meier et al. (111) war außerdem für alte heterozygote (+/hr) Mäuse eine Leukämierate von etwa 20 % im Alter von 18 Monaten berichtet worden. Wir neigen daher zu der Auffassung, daß die in der Literatur beschriebene Dominanz des Wildtyp-Allels (109) möglicherweise nicht vollständig ist.

HRS-Mäuse des Genotyps +/+ haben wir von den Jackson Laboratories bezogen. Diese Mäuse wurden durch Kreuzung von zwei heterozygoten Tieren mit anschließender Selektion der Nachkommen, die homozygot für das Wildtyp-Allel am hr-Locus waren (25 %), erhalten. Um langwierige Testkreuzungen zu vermeiden, war als Selektionskriterium die Erscheinungsform der Esterase 10 (H.J. Heiniger, pers. Mitteilung) gewählt worden, deren Locus dem hr-Locus so nahe liegt, daß bisher noch keine Rekombination zwischen beiden Loci gefunden wurde. Die Gegenwart des b-Allels der Esterase 10 weist auf das Vorhandensein des +-Allels am hr-Locus hin, während das a-Allel der Esterase 10 die Gegenwart des hr-Allels ankündigt. Einige der von Jackson bezogenen +/+ -Mäuse wurden direkt im Test verwendet, andere wurden zum Aufbau einer eigenen Linie weitergezüchtet. Im Verlauf dieser Züchtung traten jedoch haarlose Nachkommen auf, was den Verdacht auf eine Kontamination der +/+ -Zuchtpaare durch heterozygote Tiere nahelegte.

Der Befund, daß in +/+ -Mäusen im Alter von 8 Monaten der prozentuale Anteil von Lyt-1-Zellen ("reife" T-Lymphozyten)

relativ gering war, ließe sich mit einem irrtümlichen Vorkommen von +/hr-Tieren im Testmaterial erklären, da, wie wir gezeigt haben, in Milzen dieser Mäuse der Gehalt an Lyt-1-Zellen im Alter von 8 Monaten reduziert war. Alternativ könnte die Tatsache, daß die Lyt-1-Population in 8 Monate alten +/-Mäusen relativ klein war, auch eine beschleunigte Heranreifung von Lyt-1-Zellen in +/hr-Mäusen und eine noch stärker forcierte Entwicklung dieser Zellen in hr/hr-Tieren andeuten.

+/-Mäuse, die älter als 10 Monate waren, standen uns leider nicht zur Verfügung. Somit bleibt die Frage offen, ob sich in weitaus älteren +/-Mäusen eine ähnliche Disproportion der T-Zellsubpopulationen zeigt wie in +/hr- und hr/hr-Tieren zu früheren Zeitpunkten. Die Klärung dieser Frage ist wichtig im Zusammenhang mit der Wirkungsweise der hr-Mutation. Fände man tatsächlich eine Subsetdisproportion in +/-Mäusen in hohem Alter, so müßte man folgern, daß die hr-Mutation ohnehin in HRS-Mäusen ablaufende Differenzierungsvorgänge von Lyt-Subpopulationen nur verstärkt. Tritt hingegen keine Umverteilung auf, würde dies andeuten, daß die hr-Mutation kausal mit der Verteilungsstörung verknüpft ist.

Die Änderung in den Lyt-Subpopulationen war zu beobachten, ohne daß sich gleichzeitig der Prozentsatz von Thy-1- oder Lyt-positiven T-Zellen sowie von Ig- oder CR-positiven B-Zellen an der Gesamt-Lymphozyten-Population der Milz geändert hatte, ein Befund, der hier besonders hervorgehoben werden soll. Die dargestellten Daten lassen allerdings keine Aussagen über Entwicklungen im B-Zellkompartiment der Milz zu. Untersuchungen einiger B-Zellfunktionen an 3 - 4 Monate alten Tieren, die von Dr. P. Kincade in Kooperation durchgeführt worden waren, ließen bisher die mit jenen Experimenten erfaßbaren B-Zellen von hr/hr-Mäusen als normal erscheinen. So war die Häufigkeit der LPS-reaktiven Vorläuferzellen von Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen, die in

Kulturen mit limitierender Verdünnung der Zellen nach der Methode von J. Andersson (168) bestimmt worden war, bezogen auf die B-Zellen in hr/hr- und +/-hr-Milzen vergleichbar (1 LPS-reaktive Vorläuferzelle pro 3 B-Zellen). Klonierbare B-Zellen (169) in Milz, Lymphknoten und Knochenmark waren ebenfalls in beiden Genotypen in ähnlichem Ausmaß vertreten. Ebenso kooperierten, wie wir zeigen konnten (Abb. 13), isolierte B-Zellen von hr/hr- und +/-hr-Tieren gleich gut mit immunen Lyt-1₁-Zellen sowohl vom hr/hr- als auch vom +/-hr-Genotyp nach Stimulierung durch das Antigen Schafserythrozyten. Dennoch können trotz der Übereinstimmung der bisher an hr/hr- und +/-hr-Milzen gewonnenen, die B-Zellen betreffenden Daten Differenzen in anderen B-Zell-spezifischen Parametern nicht ausgeschlossen werden.

Aus bisher in der Literatur publizierten Daten geht klar hervor, daß die T-Zellpopulation in Lymphknoten und Milz einer Maus unterschiedliche Eigenschaften besitzt. So exprimieren T-Zellen in Lymphknoten das Thy-1-Antigen in geringerer Dichte auf ihrer Oberfläche, sie sind resistenter gegen adulte Thymektomie und sensitiver gegen Behandlung mit anti-Lymphozytenserum als T-Zellen in der Milz (170). Es gibt auch Hinweise darauf, daß gewisse T-Zellpopulationen vom Thymus ohne eine Passage durch die Milz direkt in die Lymphknoten einwandern können (171). Es war daher von Interesse, die Verteilung der Lyt-Sets ebenfalls in Lymphknoten zu untersuchen. Sie zeigte aber keine der Disproportion in der Milz vergleichbaren Störungen in hr/hr-Mäusen. Da andererseits für diese Experimente verschiedene Lymphknoten einschließlich der mesenterialen vereint worden waren, können wir nicht ausschließen, daß Disproportionen in einzelnen Lymphknoten bestehen.

Der Thymus war in verschiedenen Untersuchungen als wichtige Etappe im zeitlichen Ablauf der Differenzierung von T-Zellen erkannt worden (172,173). Histologischen Befunden zufolge weist der Thymus von einzelnen hr/hr-Mäusen etwa

von einem Alter von 6 Monaten an cortikale Atrophie auf (112). Es war daher denkbar, daß im Thymus von hr/hr-Mäusen altersbedingt eine Verschiebung der prozentualen Anteile von unreifen und reifen Thymozyten zugunsten der letzteren stattfindet, und daß sich diese Änderung mit serologischen Methoden (erhöhte Expression der H-2-Antigene, Auftreten von "reifen" Lyt-Subpopulationen) erfassen lassen sollte, wie schon im Falle des Thymus von AKR-Mäusen gezeigt werden konnte (150,174). Es stellte sich zudem auch die Frage, ob eine solche Störung schon im Thymus von 3 Monate alten hr/hr-Mäusen zu erkennen war, zu einem Zeitpunkt also, zu dem in der Milz die Umverteilung der Lyt-Subpopulationen einsetzte. Das Ergebnis dieser serologischen Untersuchungen war eindeutig. Sowohl die Dichte der H-2-Antigene als auch die Verteilung der Lyt-Subpopulationen ergab in hr/hr-Mäusen der Altersstufen 1 - 10 Monate keine im Vergleich zu Kontrolltieren (+/hr) signifikanten Unterschiede. Diese Daten schließen andererseits defekte Differenzierungsvorgänge im Thymus und deren Zusammenhang mit der beobachteten Disproportion der Lyt-Subsets in hr/hr-Milzen nicht aus. Sie scheinen sich jedoch nicht in einer signifikanten, serologisch erfaßbaren Störung der Proportionen von unreifen und reifen Thymozyten zu manifestieren.

Ob die Disproportion der Lyt-Zellpopulationen in HRS-Mäusen mit der auffallend hohen Leukämierate in Verbindung steht, darüber lassen sich momentan nur vage Vermutungen anstellen. Der Umstand, daß heterozygote Tiere mit einer gewissen Zeitverschiebung gegenüber homozygoten Mäusen sowohl eine Umverteilung der Proportionen der einzelnen T-Zellsubpopulationen als auch in manchen Fällen die Entwicklung von Tumoren erfahren, könnte möglicherweise im Zusammenhang gesehen werden. Für den Fall einer ursächlichen Beziehung von Subsetumverteilung und Leukämieentstehung wäre dann wohl aufgrund der zeitlichen Distanz zwischen dem Einsetzen beider Phänomene die Folgerung er-

laubt, daß die Disproportion der Subpopulationen die Tumorentstehung beeinflußt, und nicht umgekehrt eine sich entwickelnde Leukämie zu Fehlentwicklungen in der T-Zellreihe führt.

2. In vitro-Funktionen von T-Lymphozyten in Milzen von HRS-Mäusen

Die bisher beschriebenen Veränderungen innerhalb des T-Zellkompartiments der Milz von hr/hr-Mäusen dienten als Basis für die Konzeption von in vitro-Testen von Immunfunktionen dieser Mäuse in der Altersgruppe 3 - 4 Monate. Es ergaben sich unwillkürlich mehrere Fragestellungen, die hier kurz skizziert und diskutiert werden sollen.

- (i) Lassen sich Abweichungen in der Lyt-Setverteilung von hr/hr-Milzen mit Störungen korrelieren, die eventuell mit Hilfe von funktionellen Testen erfaßbar sind?

Erste positive Hinweise in diese Richtung ergaben die Testsysteme Stimulierbarkeit von Milzzellen durch das Mitogen PHA und das T-Zell-abhängige Antigen Schafserythrozyten (SRBC). PHA, welches hauptsächlich Lyt-123-Zellen zu DNA-Synthese stimuliert (159), induzierte 3 - 4 Monate alte hr/hr-Milzzellen zu doppelt so hoher Proliferation wie +/-hr-Milzzellen, während 2 Monate alte Zellen beider Genotypen unter gleichen Bedingungen ähnlich gut proliferierten. Dieses Ergebnis entsprach somit den Erwartungen. In gleichem Sinn entwickelten homozygote Milzzellen nur halb so viele anti-SRBC-Antikörper-bildende Zellen als heterozygote. Unter Einbeziehung des Befundes vergleichbarer Immunantwort von Milzzellen beider Genotypen gegen das T-Zell-unabhängige Antigen TNP-Ficoll (P. Kincade, pers. Mitteilung) ließen sich diese Resultate mit der Annahme einer reduzierten Lyt-1-Population (Helferfunktion) und einer erhöhten Lyt-123-Population (Suppressorfunktion) interpretieren.

- (ii) Resultiert die Disproportion aus Differenzierungsdefekten sowohl von Lyt-1- als auch von Lyt-123-Zellen, oder aus einem Defekt von nur einer Population (Lyt-1 oder Lyt-123) und der dadurch bedingten prozentualen Verschiebung der anderen Populationen?

In den zwei von uns getesteten in vitro-Modellen, der Zell-vermittelten Zytotoxizität (CML) und der gemischten Lymphozytenkultur (MLC), erzielten hr/hr-Milzzellen ähnliche Ergebnisse wie die Kontrollmilzzellen von +/-hr-Mäusen. Wie bereits ausgeführt, sind in beiden Testsystemen verschiedene T-Zellsubpopulationen an der jeweiligen Reaktion beteiligt. Für den Fall, daß sich in einer CML stimulierende und reagierende Zellen im gesamten H-2-Komplex voneinander unterscheiden, kooperieren Lyt-1-Zellen mit Lyt-23-Killerzellvorläufern, wobei die nachfolgende Lyse der Zielzellen durch Lyt-23-Effektoren verursacht wird (57). Unterscheiden sich dagegen Stimulator- und Responderzellen nur im H-2K/D-Bereich, so scheinen nach neueren Daten Lyt-123-Zellen zumindest für die Vorläuferphase verantwortlich zu sein (166).

Noch unklarer sind die Verhältnisse in der MLC. Hier proliferieren bei Unterschieden der Reaktionspartner im gesamten H-2-Komplex Lyt-1- und Lyt-23- (bzw. Lyt-123-) Zellen (57), oder nach anderen Angaben Lyt-1-Zellen allein (166). Demgegenüber stimulieren Differenzen, die nur auf die H-2K/D-Region beschränkt sind, Lyt-123-Zellen zu DNA-Synthese (166,175). Beschränken sich schließlich die Unterschiede zwischen Stimulator- und Responderzellen auf die I-Region, werden vorwiegend Lyt-1-Zellen zu Proliferation induziert (57).

Trotz dieser im einzelnen teilweise noch nicht exakt geklärten Verhältnisse hinsichtlich der Identität und des Beitrages der jeweils reagierenden T-Zellsubpopulationen bieten unsere CML- und MLC-Experimente immerhin Indizien zugunsten der ersteren der beiden oben angedeuteten Über-

legungen. Da Milzzellen von Homozygoten und Heterozygoten ähnlich gut in der CML und MLC reagierten, liegt der Schluß nahe, daß diejenigen Lyt-Subpopulationen, die in CML und MLC zum Zuge kommen, in hr/hr-Milzen in normalen, nicht beeinträchtigten Mengenverhältnissen vorliegen.

- (iii) Sind alle Zellen einer Population (Lyt-1 oder Lyt-123) reduziert bzw. vermehrt vorhanden, oder trifft dies nur für diskrete Untergruppierungen innerhalb der Lyt-1- oder Lyt-123-Population zu?

Wie im obigen Abschnitt diskutiert wurde, ist die mengenmäßige Repräsentation der in den Testsystemen CML und MLC beteiligten Lyt-Sets (Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123) in hr/hr-Mäusen normal. Diese Beobachtung ließ sich als ein Hinweis darauf verstehen, daß die zweite Möglichkeit, daß also diskrete Untergruppierungen innerhalb der Lyt-1- bzw. Lyt-123-Population reduziert sein könnten, zutreffen mag. Weitere Anhaltspunkte hierfür lieferten Experimente, in denen die Aktivität der isolierten Lyt-1-Population in verschiedenen funktionellen Testsituationen untersucht wurde: in der Kooperation mit B-Zellen und in der Induktion von Suppressorzellen.

Isolierte, angereicherte Lyt-1_i-Zellen von homozygoten (hr/hr) Mäusen zeigten im Vergleich zu der gleichen Anzahl von heterozygoten (+/hr) Lyt-1_i-Zellen folgende Charakteristiken:

- a) Sie ließen eine ähnliche Helferaktivität für B-Zellen erkennen. Diese manifestierte sich in einer ähnlichen Zahl Plaque-bildender Zellen, wenn die Lyt-1_i-Zellen mit isolierten B-Zellen inkubiert worden waren.
- b) Dagegen wurde eine deutlich reduzierte Fähigkeit zur Induktion von Suppressorzellen offenbar, ersichtlich aus der dreifach höheren Zahl von PFC nach Kultivierung der Lyt-1_i-Zellen mit unseparierten +/hr-Milzzellen. Unser experimenteller Ansatz war hier dem von H. Cantor beschriebenen Rückkopplungs-Inhibitionssystem (125) analog.

Wir halten die angeführten Resultate für vereinbar mit der Vorstellung, daß nur spezielle Funktionsuntergruppen innerhalb des Lyt-1-Zellpools von hr/hr-Mäusen in ihrer Entwicklung gestört sind.

Schließlich sollte die Frage untersucht werden, ob die Disproportion der T-Zellsubpopulationen in hr/hr-Mäusen auf eine mögliche Eliminierung der Lyt-1-Subpopulation durch Autoantikörper zurückzuführen ist. Einen Präzedenzfall in dieser Hinsicht bilden Mäuse des NZB-Stammes. NZB-Mäuse produzieren in hohem Maße Autoantikörper, die unter anderem mit autologen Thymozyten und T-Zellen reagieren. Von Shirai et al. (152,176) wurde berichtet, daß Autoantikörper eine Population von Suppressorzellen inaktivieren können. Es wurde argumentiert, daß infolge der dann zusätzlich gesteigerten Autoantikörperproduktion weitere T-Zellpopulationen in Mitleidenschaft gezogen werden, woraus sich die Beeinträchtigung von weiteren T-Zellfunktionen wie Stimulierbarkeit durch T-Zellmitogene, Helferaktivität für B-Zellen im SRBC-System, Graft-versus-Host-Reaktion (177) usw. mit zunehmendem Alter erklären ließen.

Die Ausschaltung einer speziellen Lyt-Zellpopulation durch Autoantikörper scheint im Falle von hr/hr-Mäusen allenfalls eine untergeordnete Rolle zu spielen, denn ein simultaner Aktivitätsanstieg verschiedener Funktionen einzelner Lyt-Populationen in MLC und CML wurde nicht gefunden. Darüberhinaus konnte serologisch gezeigt werden, daß im Serum von Mäusen beider Genotypen im kritischen Zeitraum von 1 - 3 Monaten der Gehalt an Autoantikörpern gegen Thymozyten gering bzw. gegen Milzzellen nicht nachweisbar war, und daß zwischen beiden Genotypen in dieser Hinsicht kein Unterschied bestand.

Bezüglich der Lokalisation des Defektes können nun prinzipiell zwei Möglichkeiten unterschieden werden: Die Änderung in der Verteilung der Subpopulationen könnte einmal auf interne Faktoren in den betroffenen Zellen selbst zurückzuführen sein, eine Situation, für die es in der

Erythropoiese Beispiele gibt, z.B. die Mutationen am W-Locus (178), die zu einer auf defekte Stammzellen zurückföhrbaren makrozytären Anämie föhren. Alternativ könnte der Defekt durch fehlerhafte Interaktion mit der zellulären und nicht-zellulären Umgebung bedingt sein, in die die Zellen einwandern. Dieser Fall ist z.B. bei Mutationen am Sl-Locus gegeben. Diese Mutationen föhren zu gleicher Anämie wie Mutationen am W-Locus. Die Anämie beruht jedoch auf einer defekten hämopoietisch-induktiven Umgebung, in der sich normale Stammzellen nicht hinreichend differenzieren können (178).

Mit Hilfe geeigneter Knochenmarkschimären zwischen hr/hr- und +/-hr-Tieren gelänge es, eine Entscheidung zwischen diesen beiden Alternativen herbeizuföhren. Die serologische Analyse der Lyt-Populationen in diesen Chimären sollte es ermöglichen abzuschätzen, ob die Umgebung, in die die Zellen einwandern, auf deren Lyt-Expression einen Einfluß hat. Erste, allerdings bisher preliminäre Experimente in dieser Richtung wurden von uns bereits unternommen. Sie scheinen auf eine besondere Bedeutung der zellulären Umgebung hinzuweisen.

In dieser Hinsicht könnten hr/hr-Mäuse Mäusen entsprechen, die die Mutation nu (nude) in homozygotem Zustand tragen (103). Die rezessive Mutation nu verursacht Haarlosigkeit der Tiere und bewirkt die Unfähigkeit, einen normalen Thymus auszubilden. Von M.P. Scheid war gezeigt worden, daß diese Mäuse Vorläufer von T-Zellen besitzen, die durch Zugabe des Thymushormons Thymopoietin induziert werden können, charakteristische T-Zellalloantigene wie Thy-1, TL, Lyt u.a. zu exprimieren (179). Die Defizienz des T-Zellkompartiments konnte damit unter anderem auf die Abwesenheit eines hormonalen Differenzierungsstimulus zurückgeföhrt werden, der im Normalfall vom Thymusgewebe auszugehen scheint.

Falls die Umgebung der T-Zellen für die Disproportion der Lyt-Subpopulationen verantwortlich ist, wären mehrere Ursachen in Betracht zu ziehen.

- (i) Ein induktiver Stimulus für einen oder wenige Schritte in der T-Zelldifferenzierung könnte gestört sein.

Nach heutiger Vorstellung sind Lyt-123-Zellen Vorläufer von Lyt-1- und Lyt-23-Zellen (180). Es wäre daher denkbar, daß in unserem System ein Differenzierungsteilschritt von Lyt-123 in Lyt-1 nicht induziert wird. Diese Interpretation würde vor allem der Tatsache gerecht, daß mit der Abnahme von Lyt-1-Zellen simultan eine Zunahme von Lyt-123-Zellen zu beobachten ist.

Ein möglicher Kandidat für die Rolle des Induktors für diesen Differenzierungsschritt wäre das α -Fetoprotein. Murgita et al. (181) konnten zeigen, daß T-Zellen aus der Milz adulter Tiere nach in vitro-Inkubation mit α -Fetoprotein supprimierend auf die PFC-Entwicklung von Milzzellsuspensionen einwirkten. Die suppressive Aktivität in diesem System wurde einer Lyt-1-Zelle zugeschrieben, und es ist möglich, daß diese analog dem Rückkopplungs-Suppressions-system induzierend auf Lyt-123-Zellen wirkt. Allerdings wurde der Phänotyp der Vorläuferzelle, die sich durch α -Fetoprotein zu einer Lyt-1-Zelle induzieren ließ, nicht untersucht, sodaß noch offen steht, ob diese Zelle Lyt-1- oder Lyt-123-Charakteristik besaß.

Der diskutierte Induktionsdefekt könnte sowohl im Thymus als auch in der Milz lokalisiert sein, denn die Entstehung von Lyt-1- und Lyt-23-Zellen aus Lyt-123-Vorläufern kann, wie von Stutman dargelegt, auch außerhalb des Thymus auftreten (182). Experimente, die zu einer Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten beitragen könnten, würden die Bestimmung der Lyt-Subpopulationen von Cortison-resistenten Thymozyten von hr/hr- und +/-hr-Mäusen erforderlich machen. Für den Fall, daß die "reifen" Thymozyten von hr/hr eine Disproportion ihrer Unterpopulationen analog der beschriebenen Umverteilung von Milzzellen zeigen würden, wäre dieser Befund ein deutlicher Hinweis auf eine Fehlentwicklung der Zellen im Thymus.

- (ii) Die Disproportion der Lyt-Subpopulationen hat ihre Ursache in einer gestörten Migration von T-Zellen durch die Milz.

In diesem Fall würden gewisse Lyt-1-Zellen die Milz vor-schnell passieren, während bestimmte Lyt-123-Zellen aufgehalten würden. Zum Studium hinsichtlich dieser Erklärungs-möglichkeit sind Experimente zur Migration von T-Zellsub-populationen geplant. Es sollen thymektomierte, lethal bestrahlte hr/hr- und +/hr-Rezipienten eingesetzt werden, die Knochenmarkszellen eines Genotyps, z.B. +/hr, erhalten haben, wobei diese zuvor durch in vitro-Behandlung mit anti-Thy-1-Serum und Komplement von T-Zellen befreit worden sind. Die Lokalisation von radioaktiv markierten, unseparierten T-Zellen oder T-Zellsubpopulationen vom +/hr-Genotyp in den einzelnen Organen und in den verschie-denen Regionen innerhalb eines Organs würden Rückschlüsse darauf zulassen, ob und wo Migrationsdefekte vorliegen.

Eingangs wurde das von T. Stanton und E.A. Boyse (61) ent-deckte Qa-1-Antigensystem vorgestellt, das neben den be-reits intensiver studierten Lyt-Antigensystemen als Mar-ker von T-Zellen zu deren Charakterisierung herangezogen werden kann. Ca. 60 % der Lyt-1-Zellen und mehr als 80 % der Lyt-123-Zellen in Lymphknoten von B6-TL⁺-Mäusen be-sitzen serologisch nachweisbares Qa-1-Antigen (62). Obwohl Mäuse des HRS-Stammes das Qa-1^a-Allel nicht exprimieren, ist eine Gegenüberstellung der funktionellen Charakteristi-ken von Qa-1-positiven T-Zellen in Milzen von B6-TL⁺-Mäu-sen und den beobachteten T-Zellstörungen in Milzen von HRS-Mäusen recht aufschlußreich. Wie Stanton et al. zeigen konnten, spielen Qa-1-negative T-Zellen die Hauptrolle in der MLC und CML (62). In Übereinstimmung damit zeigten Milzzellen vom hr/hr- und +/hr-Genotyp keine oder nur ge-ringe Unterschiede in diesen beiden Testsituationen. An-dererseits sind nach H. Cantor Qa-1-positive Lyt-1-Zellen Induktoren von Suppressorzellen im Rückkopplungs-Inhibitions-system (95). Mit dieser Charakteristik harmoniert der Befund,

daß die Fähigkeit von hr/hr-Zellen zur Suppressorinduktion gegenüber entsprechenden +/hr-Zellen deutlich reduziert ist. Schließlich wurde berichtet, daß sich vornehmlich Lyt-123-positive Qa-1-positive Zellen durch PHA zu DNA-Synthese induzieren lassen (62). Auch dieser Befund besitzt seine Analogie im HRS-System. Milzzellen homozygoter hr/hr-Mäuse lassen sich durch PHA doppelt so gut zu Proliferation stimulieren wie Kontrollmilzzellen von +/hr-Mäusen.

Betrachten wir die geschilderten Befunde im Zusammenhang, so ließe sich folgende Arbeitshypothese formulieren: In Milzen von homozygoten hr/hr-Mäusen liegt eine der Lyt-1:Qa-1-Population von B6-TL⁺-Milzen entsprechende Subpopulation von T-Zellen reduziert vor. Demgegenüber sind Lyt-123-Zellen, die ebenfalls eine dem Qa-1-Antigen entsprechende Struktur auf ihrer Oberfläche phänotypisch exprimiert haben sollten, im Überschuß vorhanden. Ein Beweis dieser Hypothese ist im Augenblick nicht möglich. Da Mäuse des HRS-Stammes, wie erwähnt, das bislang definierte Qa-1^a-Allel nicht besitzen, kann die Lyt-1:Qa-1-analoge Population mit heute zur Verfügung stehenden Antisera nicht isoliert werden. Zur Klärung dieser Fragestellung haben wir daher die Züchtung von haarlosen Mäusen initiiert, die das Qa-1^a-Allel tragen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Mutante hr/hr (hairless)-Mäuse sind im Vergleich zu den heterozygoten +/-hr-Tieren im Alter durch eine sehr hohe Inzidenz von Leukämie gekennzeichnet. Es war daher von Interesse, das Profil der T-Zellsubpopulationen Lyt-1, Lyt-23 und Lyt-123 im T-Zellkompartiment beider Mäusestämme vergleichend zu prüfen. Serologische und funktionell-zelluläre Untersuchungen dieser Subpopulationen werden beschrieben.

Milzzellen von homozygoten hr/hr-Mäusen zeigten eine altersabhängige Disproportion des prozentualen Anteiles der beiden T-Zellsubsets Lyt-1 und Lyt-123, die bereits in drei Monate alten Tieren erkennbar wurde. Von drei Monaten an besaßen die Milzen dieser Mäuse sowohl relativ als auch absolut gesehen weniger Zellen der Lyt-1-Klasse und mehr Zellen der Lyt-123-Klasse als die ihrer +/-hr-Geschwister. Die Änderung in den Subsetproportionen war nicht von einer Veränderung des Anteiles von Thy-1-positiven T-Zellen und Ig- oder CR-positiven B-Zellen begleitet.

Die Störung in der Verteilung der Lyt-Subsets konnte mit zwei verschiedenen, voneinander unabhängigen Testsystemen, nämlich dem Komplement-abhängigen zytotoxischen Test und dem Protein A-Rosettentest, nachgewiesen werden und wurde sowohl mit Zellsuspensionen ganzer Milzen als auch mit gereinigten T-Zellen der Milzen erhalten.

Die Lyt-Subpopulationen in Milzzellen von +/-hr-Kontrolltieren waren im Alter von drei Monaten nicht in ihrer Repräsentation gestört und glichen in ihrer prozentualen Zusammensetzung denen von gleichaltrigen B6-Milzzellen. Eine Umverteilung der T-Zellsubsets trat jedoch in einem späteren Lebensabschnitt (7-10 Monate) dieser Tiere auf. Da eine Störung im Subsetverhältnis der Milzzellen von +/-hr-Kontrollmäusen in der getesteten Zeitspanne (2-10 Monate) nicht gefunden wurde, scheint dieser Befund auf un-

vollständige Dominanz des Wildtyp-Allels am hr-locus hinzuweisen.

In Lymphknoten wurde nur in jungem Alter der Tiere (bis zu 2.5 Monate) ein geringfügiger Unterschied in der Repräsentation der T-Zellsubsets zwischen Mäusen des hr/hr- und +/hr-Genotyps gefunden.

Thymozyten beider Genotypen unterschieden sich nicht in den untersuchten serologischen Parametern im gemessenen Zeitraum (1-10 Monate).

Es gelang, die ermittelten Daten der serologischen Analyse mit verschiedenen T-Zellfunktionen in hr/hr- und +/hr-Mäusen zu korrelieren. So wiesen 3 - 4 Monate alte hr/hr-Milzzellen eine gestörte Reaktion auf das Mitogen PHA und das T-Zell-abhängige Antigen Schafserythrozyten auf. Die Reaktivität dieser Zellen gegenüber Alloantigenen, die in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) und dem Zell-vermittelten Zytotoxizitätstest (CML) gemessen wurde, war andererseits normal.

Isolierte, gereinigte Lyt-1_1 -Zellen von immunen (Antigen: SRBC) hr/hr-Milzen zeigten gegenüber vergleichbaren Lyt-1_1 -Zellen von immunen +/hr-Milzen eine ähnlich gute Helferaktivität für isolierte B-Zellen. Dagegen war ihre Suppressor-Induktoraktivität in der Wechselwirkung mit nicht-immunen Milzzellen beider Genotypen deutlich reduziert (wiederum verglichen mit der Aktivität von Lyt-1_1 -Zellen aus immunen +/hr-Tieren in Wechselwirkung mit nicht-immunen Milzzellen beider Genotypen).

Ergebnisse aus Experimenten zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Autoantikörpern auf die Repräsentation der T-Zellsubsets in Mäusen beider Genotypen lassen es als unwahrscheinlich erscheinen, daß die Disproportion der Lyt-1 -Subsets auf einer selektiven Eliminierung von Lyt-1 -Zellen durch Autoantikörper beruht.

Unter Berücksichtigung des kürzlich auf T-Zellen von B6-TL^+ -Mäusen serologisch und funktionell charakterisierten

Markers Qa-1 (Genotyp dieser Mäuse Qa-1^a mit dem Phänotyp Qa-1-positiv) sind die Befunde dieser Arbeit mit folgender Arbeitshypothese vereinbar: In Milzzellen von hr/hr-Mäusen (zuzuordnender Genotyp Qa-1^b mit dem Phänotyp Qa-1-negativ) ist von einem Alter von drei Monaten an eine der Lyt-1 : Qa-1-Population von B6-TL⁺-Milzen entsprechende T-Zellsubpopulation reduziert, während der Anteil an Lyt-123:Qa-1-Zellen gleichzeitig erhöht vorliegt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Mohr, H., P. Sitte. 1971. Molekulare Grundlagen der Entwicklung. BLV München
2. Berryll, N.J., G. Karp. 1976. Development. McGraw-Hill, New York
3. Boyse, E.A., L.J. Old. 1978. The immunogenetics of differentiation in the mouse. The Harvey Lectures, Serie 71. Academic Press, New York, S. 23
4. Maclean, N. 1976. Control of Gene Expression. Academic Press, New York
5. Miller, J.F.A.P., G.F. Mitchell. 1969. Cell to cell interaction in the immune response. Transplant. Proc. 1, 535
6. Lagrange, P.H., G.B. Mackaness, T.E. Miller. 1974. Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells. J. Exp. Med. 139, 528
7. Owen, J.J.T. 1972. The origins and development of lymphocyte populations. In: Ontogeny of acquired Immunity, CIBA-Foundation Symposium. Porter, R., J. Knight (Hrsg.). Elsevier, S. 35
8. Cline, M.J., D.W. Golde. 1979. Cellular interactions in haematopoiesis. Nature 277, 177
9. Trentin, J.J. 1970. Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation. In: Regulation of Hematopoiesis. Gordon, A.S. (Hrsg.). Appleton-Century-Crofts, New York, S. 132
10. Moore, M.A.S., J.J.T. Owen. 1967. Experimental studies on the development of the thymus. J. Exp. Med. 126, 715
11. Owen, J.J.T., M.A. Ritter. 1969. Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. J. Exp. Med. 129, 431
12. Dukor, P., J.F.A.P. Miller, W. House, V. Allman. 1965. Regulation of thymus grafts. I. Histological and cytological aspects. Transplantation 3, 639
13. Weissman, I.L. 1967. Thymus cell migration. J. Exp. Med. 126, 291
14. Parrott, D.M.V., M.A.B. de Sousa, J. East. 1966. Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. J. Exp. Med. 123, 191

15. Boyse, E.A., L.J. Old. 1969. Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics. *Ann. Rev. Genet.* 3, 269
16. Boyse, E.A., H. Cantor. 1978. Immunogenetic aspects of biologic communication: A hypothesis of evolution by program duplication. In: *Birth Defects Original Article Series*, Vol. 14, S. 249
17. Moscona, A.A. 1968. Cell aggregation: properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems. *Develop. Biol.* 18, 250
18. Boyse, E.A. 1977. The increasing value of congenic mice in biomedical research. *Proceedings of the Third Charles River International Symposium on Laboratory Animals*, Strasbourg. *Laboratory Animal Science* 27, 771
19. Flaherty, L., D. Bennet. 1973. Histocompatibilities found between congenic strains which differ at loci-determining differentiation antigens. *Transplantation* 16, 505
20. Gorer, P.A., P.O'Gorman. 1956. Cytotoxic activity of isoantibodies in mice. *Transplant. Bull.* 3, 142
21. Cantor, H., E.A. Boyse. 1975. Characterization of subclasses of T lymphocytes at different stages of thymus-dependent differentiation. In: *The Biological Activity of Thymic Hormones*. Van Bekkum, D.W. (Hrsg.). Kookyer Scientific Publications, Rotterdam, S. 77
22. Komuro, K., G. Goldstein, E.A. Boyse. 1975. Thymus-repopulating capacity of cells, that can be induced to differentiate to T cells in vitro. *J. Immunol.* 115, 195
23. Klein, J. 1975. *Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex*. Springer, Berlin
24. Weissman, I.L., S. Baird, R.L. Gardner, V.E. Papaioannou, W. Raschke. 1977. Normal and neoplastic maturation of T-lineage lymphocytes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41, S. 9
25. Boyse, E.A., L.J. Old, E. Stockert. 1965. The TL-(thymus leukemia) antigen. A review. In: *Immunopathology IVth International Symposium*, Monaco. Grabar, P., P.A. Miescher (Hrsg.). Schwabe and Co., Basel, S. 23
26. Vitetta, E.S., J.W. Uhr, E.A. Boyse. 1975. Association of a β 2-microglobulin-like subunit with H-2 and TL alloantigens on murine thymocytes. *J. Immunol.* 114, 252
27. Boyse, E.A., L.J. Old, S. Luell. 1964. Genetic determination of the TL (thymus-leukemia) antigen in the mouse. *Nature* 201, 779

28. Reif, A.E., J.M.V. Allen. 1964. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J. Exp. Med.* 120, 413
29. Raff, M.C. 1971. T and B lymphocytes in mice studied by using antisera against surface antigenic markers. *Am. J. Pathol.* 65, 467
30. Scheid, M.P., E.A. Boyse, E.A. Carswell, L.J. Old. 1972. Serologically demonstrable alloantigens of mouse epidermal cells. *J. Exp. Med.* 135, 938
31. Boyse, E.A., M. Miyazawa, T. Aoki, L.J. Old. 1968. Ly-A and Ly-B: Two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse. *Proc. Roy. Soc. B.* 170, 175
32. Itakura, K., J.J. Hutton, E.A. Boyse, L.J. Old. 1971. Linkage groups of the θ and Ly-A loci. *Nature* 230, 126
33. Boyse, E.A., K. Itakura, E. Stockert, C.A. Iritani, M. Miura. 1971. Ly-C: a third locus specifying alloantigens expressed only on thymocytes and lymphocytes. *Transplantation* 11, 351
34. Itakura, K., J.J. Hutton, E.A. Boyse, L.J. Old. 1972. Genetic linkage relationships of loci specifying differentiation alloantigens in the mouse. *Transplantation* 13, 239
35. Durda, P.J., P.D. Gottlieb. 1978. Sequential precipitation of mouse thymocyte extracts with anti-Lyt-2 and anti-Lyt-3 sera. I. Lyt-2.1 and Lyt-3.1 antigenic determinants reside on separable molecular species. *J. Immunol.* 121, 983
36. Durda, P.J., P.D. Gottlieb. 1976. The Ly-3 antigens on mouse thymocytes: Immune precipitation and molecular weight characterization. *J. Exp. Med.* 144, 476
37. Durda, P.J., C. Shapiro, P.D. Gottlieb. 1978. Partial molecular characterization of the Ly-1 alloantigen on mouse thymocytes. *J. Immunol.* 120, 53
38. Scheid, M.P., G. Goldstein, U. Hämmerling, E.A. Boyse. 1975. Lymphocyte differentiation from precursor cells in vitro. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 249, 531
39. Scheid, M.P., G. Goldstein, E.A. Boyse. 1978. The generation and regulation of lymphocyte populations. Evidence from differentiative induction systems in vitro. *J. Exp. Med.* 147, 1727
40. Komuro, K., E.A. Boyse. 1973. In vitro demonstration of thymic hormone in the mouse by conversion of precursor cells into lymphocytes. *Lancet*, 740

41. Goldstein, G. 1975. The isolation of thymopoietin (thymin). *Annals N.Y. Acad. Sci.* 249, 177
42. Scheid, M.P., M.K. Hoffmann, K. Komuro, U. Hämmerling, J. Abbott, E.A. Boyse, G.H. Cohen, J.A. Hooper, R.S. Schulof, A.L. Goldstein. 1973. Differentiation of T cells induced by preparations from thymus and by non-thymic agents. *J. Exp. Med.* 138, 1027
43. Basch, R.S., G. Goldstein, 1974. Induction of T cell differentiation in vitro by thymine, a purified polypeptide hormone of the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1474
44. Touraine, J.L., J.W. Hadden, R.A. Good. 1977. Sequential stages of human T lymphocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3414
45. Boyse, E.A., J. Abbott. 1975. Surface reorganization as an initial inductive event in the differentiation of prothymocytes to thymocytes. *Fed. Proc.* 34, 24
46. Storrie, B., G. Goldstein, E.A. Boyse, U. Hämmerling. 1976. Differentiation of thymocytes: Evidence that induction of the surface phenotype requires transcription and translation. *J. Immunol.* 116, 1358
47. Melchers, F., J. Andersson. 1973. Synthesis, surface deposition and secretion of immunoglobulin M in bone marrow-derived lymphocytes before and after mitogenic stimulation. *Transplant. Rev.* 14, 76
48. Dutton, R.W. 1973. Inhibitory and stimulatory effects of Concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspensions to antigens. II. Evidence for separate stimulatory and inhibitory cells. *J. Exp. Med.* 138, 1496
49. Small, M. 1978. Opposing reactivities of subpopulations of T lymphocytes toward syngeneic tumor cells: Separation of early thymocytes. *J. Immunol.* 121, 1167
50. Blomgren, H., B. Andersson. 1971. Characteristics of the immunocompetent cells in the mouse thymus: Cell population changes during cortisone-induced atrophy and subsequent regeneration. *Cell. Immunol.* 1, 545
51. Leckband, E., E.A. Boyse. 1971. Immunocompetent cells among mouse thymocytes: A minor population. *Science* 172, 1258
52. Tigelaar, R.E., R.K. Gershon, R. Asofsky. 1975. Graft-versus-host reactivity of mouse thymocytes: Effect of in vitro treatment with anti-TL serum. *Cell. Immunol.* 19, 58

53. Shortman, K. 1977. The pathway of T-cell development within the thymus. *Progress in Immunology*, Vol. 3. Mandel, T.E., C. Cheers, C.S. Hosking, J.F.C. McKenzie, G.J.V. Nossal (Hrsg.). North-Holland, Amsterdam, S. 197
54. Irlé, C., P.-F. Piguet, P. Vassalli. 1978. In vitro maturation of immature thymocytes into immunocompetent T cells in the absence of direct thymic influence. *J. Exp. Med.* 147, 32
55. Hämmerling, U., H.J. Eggers. 1970. Quantitative measurement of uptake of alloantibody on mouse lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* 17, 95
56. Stackpole, C.W., T. Aoki, E.A. Boyse, L.J. Old, J. Lumley-Frank, E. de Harven. 1971. Cell surface antigens: Serial sectioning of single cells as an approach to topographical analysis. *Science* 172, 472
57. Cantor, H., E.A. Boyse. 1975. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J. Exp. Med.* 141, 1376
58. Cantor, H., E.A. Boyse. 1977. Lymphocytes as models for the study of mammalian cellular differentiation. *Immunol. Rev.* 33, 105
59. McDougal, J.S., F.W. Shen, P. Elster. 1979. Generation of T helper cells in vitro. V. Antigen-specific Ly1⁺ T cells mediate the helper effect and induce feedback suppression. *J. Immunol.* 122, 437
60. Huber, B., H. Cantor, F.W. Shen, E.A. Boyse. 1976. Independent differentiative pathways of Ly1 and Ly23 subclasses of T cells: Experimental production of mice deprived of selected T cell subclasses. *J. Exp. Med.* 144, 1128
61. Stanton, T.H., E.A. Boyse. 1976. A new serologically defined locus in the Tla-region of the mouse, Qa-1. *Immunogenetics* 3, 525
62. Stanton, T.H., C.E. Calkins, J. Jandinski, D.J. Schendel, O. Stutman, H. Cantor, E.A. Boyse. 1978. The Qa-1 antigenic system: Relation of Qa-1 phenotypes to lymphocyte sets, mitogen responses and immune functions. *J. Exp. Med.* 148, 963
63. Flaherty, L., T.H. Stanton, E.A. Boyse. 1977. Contamination of Ia antiserum A.TL anti-A.TH with antibodies related to the Tla region. *Immunogenetics* 4, 101

64. David, C.S., D.C. Shreffler, J.A. Frelinger, 1973. New lymphocyte antigens controlled by the Ir region of the mouse H-2 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2509
65. Shreffler, D.C., C.S. David, D. Götze, J. Klein, H. McDavitt, D. Sachs. 1974. Genetic nomenclature for new lymphocyte antigens controlled by the Ir region of the H-2 complex. *Immunogenetics* 1, 189
66. Katz, D.H., B. Benacerraf. 1975. The function and inter-relationship of T cell receptors, Ir genes and other histocompatibility gene products. *Transplant. Rev.* 22, 175
67. McDavitt, H.O. (Hrsg.). 1978. Ir Genes and Ia Antigens. Academic Press, New York
68. Frelinger, J.A., J.E. Niederhuber, C.S. David, D.C. Shreffler. 1974. Evidence for the expression of Ia (H-2 associated) antigens on thymus-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* 140, 1273
69. Hämmerling, G.J., B.D. Deak, G. Mauve, U. Hämmerling, H.O. McDavitt. 1974. B lymphocyte alloantigens controlled by the I region of the major histocompatibility complex in mice. *Immunogenetics* 1, 68
70. Hämmerling, G.J., G. Mauve, E. Goldberg, H.O. McDavitt. 1974. Tissue distribution of Ia antigens: Ia on spermatozoa, macrophages and epidermal cells. *Immunogenetics* 1, 428
71. Forsum, U., L. Klareskog, P.A. Peterson. 1979. Distribution of Ia-antigen-like molecules on non-lymphoid tissues. *Scand. J. Immunol.* 9, 343
72. Kisielow, P., J. Hirst, H. Shiku, P.C.L. Beverly, M.K. Hoffman, E.A. Boyse, H.F. Oettgen. 1975. Ly antigens: Markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse. *Nature* 253, 219
73. Shiku, H., P. Kisielow, M.A. Bean, T. Takahashi, E.A. Boyse, H.F. Oettgen, L.J. Old. 1975. Expression of T cell differentiation antigens on effector cells in cell mediated cytotoxicity in vitro. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. *J. Exp. Med.* 141, 227
74. Zinkernagel, R.M., P.C. Doherty. 1974. Restriction of in vitro T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis with a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701

75. Brunner, K.T., J. Mauel. H. Rudolf, B. Chapuis. 1968. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunol.* 14, 181
76. Beverly, P.C.L., J. Woody, M. Dunkley, M. Feldmann, I.F.C. McKenzie. 1976. Separation of suppressor and killer T cells by surface phenotype. *Nature* 262, 495
77. Tse, H.Y., R.W. Dutton. 1977. Separation of helper and suppressor T lymphocytes. II. Ly phenotypes and lack of DNA synthesis requirement for the generation of Concanavalin A helper and suppressor cells. *J. Exp. Med.* 146, 747
78. Jandinski, J., H. Cantor, T. Tadakuma, D.L. Peavy, C.W. Pierce. 1976. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: Suppressor and helper activities are inherent properties of distinct T cell subclasses. *J. Exp. Med.* 143, 1382
79. Rölinghoff, M., A. Starzinski-Powitz, K. Pfizenmaier, H. Wagner. 1977. Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the in vivo generation of antigen-specific cytotoxic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 145, 453
80. Herzenberg, L.A., K. Okumura, H. Cantor, V.L. Sato, F.W. Shen, E.A. Boyse. 1976. T cell regulation of antibody responses: Demonstration of allotype-specific helper T cells and their specific removal by suppressor T cells. *J. Exp. Med.* 144, 330
81. Feldmann, M., P.C.L. Beverly, J. Woody, I.F.C. McKenzie. 1977. T - T interactions in the induction of suppressor and helper T cells: Analysis of membrane phenotype of precursor and amplifier cells. *J. Exp. Med.* 145, 793
82. Taniguchi, M., J.F.A.P. Miller. 1977. Enrichment of specific suppressor T cells and characterization of their surface markers. *J. Exp. Med.* 146, 1450
83. Okumura, K., T. Takemori, T. Tokuhisa, T. Tada. 1977. Specific enrichment of the suppressor T cell bearing I-J determinants. I. Parallel functional and serological characterizations. *J. Exp. Med.* 146, 1234
84. Zinkernagel, R.M. 1978. Thymus and lymphohemopoietic cells: Their role in T cell maturation in selection of T cell's H-2-restriction-specificity and in H-2-linked Ir gene control. *Immunol. Rev.* 42, 224

85. Grinwich, K.D., T.S. Alexander, J. Cerny. 1979. Properties of murine leukemia-associated suppressor cells. I. Preferential suppression of thymus-dependent antibody responses and the requirement for syngeneity in the K region of the H-2 complex. *J. Immunol.* 122, 1108
86. Sprent, J. 1978. Role of H-2 gene products in the function of T helper cells from normal and chimeric mice measured in vivo. *Immunol. Rev.* 42, 108
87. Feldmann, M., P.C.L. Beverly, M. Dunkley, S. Kontianen. 1975. Different Ly antigen phenotypes of in vitro induced helper and suppressor cells. *Nature* 258, 614
88. Wagner, H. 1973. Synergy during in vitro cytotoxic allograft responses. I. Evidence for cell interaction between thymocytes and peripheral T cells. *J. Exp. Med.* 138, 1379
89. Wagner, H., G. Hämmerling, M. Röllinghoff. 1975. Enhanced in vitro cytotoxic anti H-2 responses in the presence of Ia antigens. *Immunogenetics* 2, 257
90. Cantor, H., E.A. Boyse. 1975. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly⁺ cells in the generation of killer activity. *J. Exp. Med.* 141, 1390
91. Huber, B., O. Devinsky, R.K. Gershon, H. Cantor. 1976. Cell-mediated immunity: delayed-type hypersensitivity and cytotoxic responses are mediated by different T cell subclasses. *J. Exp. Med.* 143, 1424
92. Bach, F.H., K.N. Voynow. 1966. One-way stimulation in mixed leukocyte cultures. *Science* 153, 545
93. Nagy, Z., B.E. Elliot, M. Nabholz. 1976. Specific binding of K- and I-region products of the H-2 complex to activated thymus-derived (T) cells belonging to different Ly subclasses. *J. Exp. Med.* 144, 1545
94. Eardley, D.D., J. Hugenberger, L. McVay-Boudreau, F.W. Shen, R.K. Gershon, H. Cantor. 1978. Immunoregulatory circuits among T cell sets. I. T-helper cells induce other T cell sets to exert feedback inhibition. *J. Exp. Med.* 147, 1106
95. Cantor, H., J. Hugenberger, L. McVay-Boudreau, D.D. Eardley, J. Kemp, F.W. Shen, R.K. Gershon. 1978. Immunoregulatory circuits among T cell sets. Identification of a subpopulation of T-helper cells that induces feedback inhibition. *J. Exp. Med.* 148, 871
96. Cantor, H., E.A. Boyse. 1977. Regulation of cellular and humoral immune response by T cell subclasses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41, 23

97. Tada, T. 1977. Regulation of the antibody response by T cell products determined by different I sub-regions. In: Immune System, Genetics and Regulation. Vol. 6, Sercarz, E.E., L.A. Herzenberg (Hrsg.). C.F. Fox, S. 345
98. Eardley, D.D., F.W. Shen, R.E. Cone, R.K. Gershon. 1979. Antigen-binding T cells: Dose response and kinetic studies on the development of different subsets. J. Immunol. 122, 140
99. Moretta, L., M.C. Mingari, S.R. Webb, E.R. Pearl, P.M. Lydyard, C.E. Grossi, A.R. Lawton, M.D. Cooper. 1977. Imbalances in T cell subpopulations associated with immunodeficiency and autoimmune syndromes. Eur. J. Immunol. 7, 696
100. Brouet, J.-C., A. Chevalier. 1979. Serologically defined subpopulations of human T lymphocytes. J. Immunol. 122, 260
101. Evans, R.L., J.M. Breard, H. Lazarus, S.F. Schlossman, L. Chess. 1977. Detection, isolation and functional characterization of two human T cell subclasses bearing unique differentiation antigens. J. Exp. Med. 145, 221
102. Flanagan, S.P. 1966. "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet. Res., Camb. 8, 295
103. Pantelauris, E.M. 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. Nature 217, 370
104. Sher, J., A.D. Steinberg, A.K. Beming, W.E. Paul. 1975. X-linked B lymphocyte immune defect in CBA/N mice. II. Studies of the mechanism underlying the immune defect. J. Exp. Med. 142, 637
105. Watson, J., R. Riblet. 1974. Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides. J. Exp. Med. 140, 1147
106. Coutinho, A., L. Forni, F. Melchers, T. Watanabe. 1977. Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. Eur. J. Immunol. 7, 325
107. Forni, L., A. Coutinho. 1978. An antiserum which recognizes lipopolysaccharide-reactive B cells in the mouse. Eur. J. Immunol. 8, 56
108. Motagna, W., H.B. Chase, H.P. Melaragno. 1952. The skin of hairless mice. I. The formation of cysts and the distribution of lipids. J. Invest. Dermatol. 19, 83

109. Crew, F.A.E., L. Mirskaia. 1932. The character "hairless" in the mouse. J. Genetics 25, 17
110. Brooke, H.C. 1926. Hairless mice. J. Heredity 17, 173
111. Meier, H., D.D. Myers, R.J. Huebner. 1969. Genetic control by the hr-locus of susceptibility and resistance to leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 759
112. Heiniger, H.J., H. Meier, N. Kaliss, M. Cherry, H.W. Chen, R.D. Stoner. 1974. Hereditary immunodeficiency and leukemogenesis in HRS/J mice. Cancer Research 34, 201
113. Mishell, F.J., R.W. Dutton. 1967. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. J. Exp. Med. 126, 423
114. Koo, G.C., C.L. Goldberg. 1978. A simplified technique for H-Y typing. J. Immunol. Methods 23, 197
115. Goding, J.W. 1976. The chromium chloride method of coupling antigens to erythrocytes: definition of some important parameters. J. Immunol. Methods 10, 61
116. Boyse, E.A., L.J. Old, J. Chouroulinkov. 1964. Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. In: Methods in Medical Research, Vol. 19. H. Eisen (Hrsg.). Year Book Medical Publ., Chicago, S. 39
117. Boyse, E.A., H. Cantor, F.W. Shen, I.F.C. McKenzie. 1977. Nomenclature for antigens demonstrable on lymphocytes. Immunogenetics 5, 189
118. Klein, J. 1973. List of congenic lines of mice. I. Lines with differences at alloantigen loci. Transplantation 15, 137
119. Shen, F.W., E.A. Boyse, H. Cantor. 1975. Preparation and use of Ly antisera. Immunogenetics 2, 591
120. Schlesinger, M. 1965. Immune lysis of thymus and spleen cells of embryonic and neonatal mice. J. Immunol. 94, 358
121. Boyle, W. 1968. An extension of the ⁵¹Cr-release assay for the estimation of mouse cytotoxins. Transplantation 6, 761
122. Canty, T.G., J.R. Wunderlich. 1970. Quantitative in vitro assay of cytotoxic cellular immunity. J. Natl. Cancer Inst. 45, 761

123. Julius, M.H., E. Simpson, L.A. Herzenberg. 1973. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 3, 645
124. Andersson, J., L. Lafleur, F. Melchers. 1974. IgM in bone marrow-derived lymphocytes. Synthesis, surface deposition, turnover and carbohydrate composition in unstimulated mouse B cells. *Eur. J. Immunol.* 4, 170
125. Cantor, H., L. McVay-Boudreau, J. Hugenberg, K. Naidorf, F.W. Shen, R.K. Gershon. 1978. Immunoregulatory circuits among T cell sets. II. Physiologic role of feedback inhibition in vivo: absence in NZB mice. *J. Exp. Med.* 147, 1116
126. Jerne, N.K., A.A. Nordin. 1963. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140, 405
127. Cunningham, A.J., A. Szenberg. 1968. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology* 14, 599
128. Sachs, L. 1970. *Statistische Methoden*. Springer Verlag, Heidelberg, S. 50
129. Dorval, G., K.J. Welsh, H. Wigzell. 1974. Labelled staphylococcal protein A as an immunological probe in the analysis of cell surface markers. *Scand. J. Immunol.* 3, 405
130. Wigzell, H. 1965. Quantitative titrations of mouse H-2 antibodies using ^{51}Cr -labelled target cells. *Transplantation* 3, 423
131. Amos, D.B., H. Bashir, W. Boyle, M. McQueen, A. Tillikainen. 1969. A simple microcytotoxicity test. *Transplantation* 7, 220
132. Mandle, R.J., Jr., J.A. McConnell, U.R. Nilsson. 1977. Inhibition of complement by mouse serum: Selective inactivation of the fourth component of human complement. *J. Immunol.* 119, 180
133. Boyse, E.A., L.J. Old, E. Stockert. 1962. Some further data on cytotoxic isoantibodies in the mouse. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 99, 574
134. Haughton, G., M.P. McGehee. 1969. Cytolysis of mouse lymph node cells by alloantibody: a comparison of guinea-pig and rabbit complements. *Immunology* 16, 447
135. Reske-Kunz, A.B., M.P. Scheid, J. Abbott, L.J. Metakis, M.J. Polley, E.A. Boyse. 1979. The action of complement in the lysis of mouse sarcoma cells sensitized with H-2 alloantibody. *Transplantation*, im Druck

136. Glimcher, L., F.W. Shen, H. Cantor. 1977. Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell. *J. Exp. Med.* 145, 1
137. Durda, P.J., S.C. Boos, P.D. Gottlieb. 1979. T 100: A new murine cell surface glycoprotein detected by anti-Lyt-2.1 serum. *J. Immunol.* 122, 1407
138. Boyse, E.A., E. Bressler, C.A. Iritani, M. Lardis. 1970. Cytotoxic γ M autoantibody in mouse alloantisera. *Transplantation* 9, 339
139. Raff, M.C. 1971. Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice. *Transplant. Rev.* 6, 52
140. Rowe, D.S., K. Hug, L. Forni, P. Pernis. 1973. Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor. *J. Exp. Med.* 138, 965
141. Bianco, C., R. Patrick, V. Nussenzweig. 1970. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. I. Characterization and separation. *J. Exp. Med.* 132, 702
142. Bianco, C., V. Nussenzweig. 1971. Theta-bearing and complement-receptor-bearing lymphocytes are distinct populations of cells. *Science (Wash.)* 173, 154
143. Spear, P.G., A.L. Wang, U. Rutishauser, G.M. Edelman. 1973. Characterization of splenic lymphoid cells in fetal and newborn mice. *J. Exp. Med.* 138, 557
144. Gelfand, M.C., G.J. Elfenbein, M.M. Frank, W.E. Paul. 1974. Ontogeny of B lymphocytes. I. In vitro appearance of Ig-bearing lymphocytes. *Cell. Immunol.* 14, 460
145. Ghetie, V., K. Nilsson, J. Sjöquist. 1974. Detection and quantitation of IgG on the surface of human lymphoid cells by rosette formation with protein A-coated sheep red blood cells. *Eur. J. Immunol.* 4, 500
146. Goudswaard, J., J.A. Van Der Donk, A. Noordzij, R.H. Van Dam, J.-P. Vaerman. 1978. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scand. J. Immunol.* 8, 21
147. MacKenzie, M.R., G.A. Gutman, N.L. Warner. 1978. The binding of murine IgM to staphylococcal A protein. *Scand. J. Immunol.* 7, 367
148. Tada, T., T. Takemori, K. Okumura, N. Nonaka, T. Tokuhisa. 1978. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response. Independent and synergistic effects of Ia^- and Ia^+ helper T cells. *J. Exp. Med.* 147, 446

149. Krammer, P.H., R. Citronbaum, S.E. Read, L. Forni, R. Lang. 1976. Murine thymic lymphomas as model tumors for T cell studies: T cell markers, immunoglobulin and F_c-receptors on AKR-thymomas. *Cell. Immunol.* 21, 97
150. Kawashima, K., H. Ikeda, E. Stockert, T. Takahashi, L.J. Old. 1976. Age related changes in cell surface antigens of preleukemic AKR thymocytes. *J. Exp. Med.* 144, 193
151. Metcalf, D.J. 1966. Histologic and transplantation studies on preleukemic thymus of the AKR mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 37, 425
152. Shirai, T., K. Hayakawa, K. Okumura, T. Tada. 1978. Differential cytotoxic effect of natural thymocytotoxic autoantibody of NZB mice on functional subsets of T cells. *J. Immunol.* 120, 1924
153. Stobo, J.D. 1972. Phytohemagglutinin and Concanavalin A: Probes for murine "T" cell activation and differentiation. *Transplant. Rev.* 11, 60
154. Melchers, F., J. Andersson. 1974. Proliferation and maturation of bone marrow-derived lymphocytes. In: *Cellular Selection and Regulation in the Immune Response*. Edelman, G.M. (Hrsg.). Raven Press, New York, S. 217
155. Shortman, K., A. Ryden, M. Dunkley, H. von Boehmer. 1977. Some requirements for the response of separated T cell subpopulations to the mitogens phytohemagglutinin and Concanavalin A. *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 55, 585
156. Dutton, R.W. 1973. Inhibitory and stimulatory effects of Concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspensions to antigen. II. Evidence for separate stimulatory and inhibitory cells. *J. Exp. Med.* 138, 1496
157. Stobo, J.D., W.E. Paul. 1973. Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. III. Differential responsiveness of T cells to phytohemagglutinin and Concanavalin A as a probe for T cell subsets. *J. Immunol.* 110, 362
158. Callard, R.E., A. Basten. 1978. Identification of T cell subpopulations binding phytohemagglutinin: functional characteristics. *Eur. J. Immunol.* 8, 247
159. Hirst, J.A., P.C.L. Beverley, P. Kisielow, M.K. Hoffmann, H.F. Oettgen. 1975. Ly antigens: Markers of T cell function on mouse spleen cells. *J. Immunol.* 115, 1555

160. Claman, H.N., E.A. Chaperon, R.F. Triplett. 1966. Thymus-marrow cell combinations-synergism in antibody production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122, 1167
161. Mitchison, N.A. 1971. The carrier-effect in the secondary response to hapten protein conjugates. II. Cellular cooperation. *Eur. J. Immunol.* 1, 18
162. Rajewsky, K., V. Schirrmacher, S. Nase, N.K. Jerne. 1969. The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity. *J. Exp. Med.* 129, 1131
163. Raff, M.C. 1970. Role of thymus-derived lymphocytes in the secondary humoral immune response in mice. *Nature* 226, 1275
164. v. Boehmer, H. 1974. Separation of T and B lymphocytes and their role in the mixed lymphocyte reaction. *J. Immunol.* 112, 70
165. Lemonnier, F., S.J. Burakoff, M. Mescher, M.E. Dorf, B. Benacerraf. 1978. Inhibition of the induction of cytolytic T lymphocytes with alloantisera directed against H-2K and H-2D gene products. *J. Immunol.* 120, 1717
166. Bach, F., B.J. Alter. 1978. Alternative pathways of T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 148, 829
167. Vadas, M.A., J.F.A.P. Miller, I.F.C. McKenzie, S.E. Chism, F.W. Shen, E.A. Boyse, J.R. Gamble, A.M. Whitelaw. 1976. Ly and Ia phenotypes of T cells involved in delayed-type hypersensitivity and in suppression. *J. Exp. Med.* 144, 10
168. Andersson, J., A. Coutinho, W. Lernhardt, F. Melchers. 1977. Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion in vitro of every growth-inducible B lymphocyte. *Cell* 10, 27
169. Kurland, J.I., P.W. Kincade, M.A.S. Moore. 1977. Regulation of B lymphocyte clonal proliferation by stimulatory and inhibitory macrophage-derived factors. *J. Exp. Med.* 146, 1420
170. Cantor, H., E. Simpson, V.L. Sato, C.G. Fathman, L.A. Herzenberg. 1975. Characterization of subpopulations of T-lymphocytes. I. Separation and functional studies of peripheral T cells binding different amounts of fluorescent anti-Thy-1.2 (theta) antibody using a fluorescence-activated cell sorter (FACS). *Cell Immunol.* 15, 180

171. Lozzio, B.B., L.B. Wargon. 1974. Immune competence of hereditarily asplenic mice. *Immunology* 27, 167
172. Good, R.A., A.E. Gabrielsen. 1964. The Thymus in Immunobiology. Hoeber Medical Books, New York.
173. Zinkernagel, R.M., G.N. Callahan, A. Althage, S. Cooper, P.A. Klein, J. Klein. 1978. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: Evidence for dual recognition? *J. Exp. Med.* 147, 882
174. Chazan, R., N. Haran-Ghera. 1976. The role of thymus subpopulations in "T" leukemia development. *Cell Immunol.* 23, 356
175. Dutton, R.W., P.R. Panfili, S.L. Swain. 1978. Allo-reactivity, the development of the T cell repertoire and the understanding of T cell function. *Immunol. Rev.* 42, 20
176. Shirai, T., T. Yoshiki, R.C. Mellors. 1972. Thymus dependence of cells in peripheral lymphoid tissues and in the circulation sensitive to natural thymocytotoxic autoantibody in NZB mice. *J. Immunol.* 109, 32
177. Simonsen, M. 1962. Graft-versus-host reactions. Their natural history, and applicability as tools of research. *Progr. Allergy* 6, 349
178. Russell, E.S. 1970. Abnormalities of erythropoiesis associated with mutant genes in mice. In: Regulation of Hematopoiesis, Vol. 1: Red cell production. Gordon, A.S. (Hrsg.). Appleton-Century-Crofts, New York, S. 649
179. Scheid, M.P., G. Goldstein, E.A. Boyse. 1975. Differentiation of T cells in nude mice. *Science* 190, 1211
180. Cantor, H., E.A. Boyse. 1977. Regulation of the immune response by T cell subclasses. In: Contemporary Topics in Immunobiology, Vol. 7 Stutman, O. (Hrsg.). Plenum Press, New York, S. 47
181. Murgita, R.A., E.A. Goidl, S. Kontiainen, P.C.L. Beverley, H. Wigzell. 1978. Adult murine T cells activated in vitro by α -fetoprotein and naturally occurring T cells in newborn mice: Identity in function and cell surface differentiation antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2897
182. Stutman, O. 1978. Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol. Reviews* 42, 138

Lebenslauf

2. März 1949 Angelika Reske-Kunz, geboren als Tochter des Juristen Dr. Wilhelm Kunz und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Vollmering, in Hornberg/Schwarzwald.
- 1956 - 1968 Besuch der Grundschule und des mathemat.-naturwissenschaftl. Droste-Hülshoff-Gymnasiums in Freiburg i. Br. mit dem Abschluß Abitur.
- 1968 - 1970 Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg.
- 1970 - 1971 Fortsetzung des Studiums der Biologie an der Ruprecht-Karl-Universität in Heidelberg.
- 1971 - 1973 Fortsetzung des Studiums der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg und Abschluß dieses Studiums mit der Diplom-Biologen-Hauptprüfung (Sommersemester 1973).
- 1973 - 1974 Anfertigung einer experimentellen Diplomarbeit mit dem Thema "Untersuchungen zum Aminosäuretransport von Lipopolysaccharid-stimulierten B-Lymphozyten" unter der Leitung von Prof. Dr. Fritz Melchers am Institut für Immunologie, Basel, Schweiz.
30. Dez. 1974 Eheschließung mit Dr. Konrad Reske, Biochemiker.
- 1975 - 1976 Untersuchungen zur Antikörper-Komplement-abhängigen Lyse von kernhaltigen Zellen in den Labors von Prof. Dr. Edward A. Boyse, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA, und Dr. Margaret J. Polley, Cornell University Medical College, New York.
- Juni 1976 -
Oktober 1978 Durchführung des experimentellen Teils der Dissertation "Charakterisierung von T-Lymphozyten-Subpopulationen in HRS (hairless)-Mäusen" unter der Leitung von Prof. Dr. Edward A. Boyse und Dr. Margrit P. Scheid am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York.
- Dezember 1977 -
Mai 1978 Studienaufenthalt: im Labor von Prof. Dr. Harvey Cantor an der Harvard Medical School, Boston, USA.

